

# 博士論文

## サンドイッチ培養肝細胞を用いた 薬物の輸送及び代謝のモデル解析

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科  
創薬科学専攻  
薬物動態学研究室

学 籍 番 号	1229012012
氏 名	松永 憲和
主任指導教員名	玉井 郁巳

## 目次

第一章 序論.....	4
第二章 サンドイッチ培養肝細胞を用いた paroxetine の代謝及び輸送の種差 .....	11
第一節 <sup>3</sup> H-Paroxetine の代謝物組成の比較 .....	12
第二節 サンドイッチ培養肝細胞における paroxetine 及び代謝物の毛細胆管腔移行 .....	17
第三節 M1-G 及び M1-S のトランスポーター基質評価 .....	21
第四節 小括.....	26
第三章 MPA 及び代謝物の肝動態モデリング .....	28
第一節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞における MPAG の肝取り込み及び胆汁中排泄 .....	29
第二節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での MPA 及び MPAG の肝動態 .....	34
第三節 MPAG の輸送に関与する MRPs の同定.....	39
第四節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中の MPA 及び MPAG 肝動態モデリング .....	44
第五節 小括.....	53
第四章 モデリング解析による MPA と CsA 間の相互作用評価 .....	55
第一節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 相互作用試験.....	56
第二節 ヒト肝ミクロソームを用いた <i>in vitro</i> 代謝阻害試験.....	61
第三節 モデリング解析による CsA の阻害パラメータ算出 .....	64
第四節 小括.....	69
第五章 Bosentan 及び代謝物の肝動態モデリング .....	72
第一節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での bosentan 及び代謝物の肝動態 .....	73
第二節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中の bosentan 及び代謝物の肝動態モデリング .....	80
第三節 ヒト肝ミクロソームを用いた新規代謝経路探索 .....	84
第四節 新規代謝経路を組み込んだモデリング再解析 .....	90
第五節 小括.....	96
第六章 結論.....	98
第七章 謝辞.....	100
第八章 引用文献.....	101
第九章 参考文献.....	111

## 略語一覧

略語	内容
$^3\text{H}$	tritium
ABC	ATP-binding cassette
AMP	adenosine 5'-monophosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
AcMPA	MPA acyl-glucuronide
BCRP/Bcrp	breast cancer resistance protein
BEI	biliary excretion index
BSEP/Bsep	bile salt export pump
CE	collision energy
$\text{CL}_{\text{uptake,int}}$	intrinsic uptake clearance
COMT	catechol- <i>O</i> -methyltransferase (カテコール- <i>O</i> -メチル転移酵素)
CXP	collision cell exit potential
CYP	cytochrome P450 (シトクロム P450)
CsA	cyclosporin A
DP	declustering potential
EMA	The European Medicines Agency (欧州医薬品庁)
FDA	The United States Food and Drug Agency (米国食品医薬品局)
HBSS	Hanks' balanced salt solution (ハンクス緩衝液)
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
$\text{IC}_{50}$	concentration producing 50% of $\text{I}_{\text{max}}$ ( $\text{I}_{\text{max}}$ に対して 50%の効果を示すときの濃度)
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
IMPDH	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (イノシンーリン酸脱水素酵素)
$\text{I}_{\text{inlet,max}}$	estimated maximum inhibitor concentration at the inlet to the liver (肝臓入口における阻害剤の予想最大濃度)
$\text{I}_{\text{max}}$	maximum inhibition (最大阻害率)
$\text{K}_i$	inhibition constant (阻害定数)
$\text{K}_m$	Michaelis-Menten constant (ミカエリス定数)
LC-MS	liquid chromatography with mass spectrometry (液体クロマトグラフィー質量分析)
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフィータ ンデム型質量分析)
M&S	modeling & simulation (モデリング&シミュレーション)
M1	methylated paroxetine-catechol

M1-G	M1-glucuronide
M1-S	M1-sulfate
M4	hydroxylated Ro 47-8634 at phenolic position
MBDD	model-based drug development
MIST	Industry Safety Testing of Drug Metabolites
MPA	mycophenolic acid
MPAG	MPA phenyl-glucuronide
MRP/Mrp	multidrug resistance-associated protein
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
OATP	organic anion transporting polypeptide
P-gp	P-glycoprotein (P-糖蛋白質)
PAPS	adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate
PBPK	physiologically based pharmacokinetics (生理学的薬物動態)
PMDA	Pharmaceuticals Medical Devices Agency, Japan (独立行政法人医薬品医療機器総合機構)
$P_{\text{dif}}$	passive diffusion (単純拡散)
QC	quality control
QTLI	quantitative time-lapse imaging
Ro 47-8634	<i>O</i> -demethylated bosentan at phenolic methyl ether position
Ro 48-5033	hydroxylated bosentan at <i>t</i> -butyl position
Ro 64-1056	combination of hydroxylation and <i>O</i> -demethylation of bosentan
S.D.	standard deviation (標準偏差)
S9	9000g supernatant of tissue homogenate (組織ホモジネートの 9000g 上清)
SAM	<i>S</i> -(5'-adenosyl)-L-methionine
SD	Sprague Dawley 系
SDS	sodium dodecyl sulfate (ラウリル硫酸ナトリウム)
SULT	sulfotransferases (硫酸転移酵素)
UDPGA	uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDP グルクロン酸)
UGT	UDP glucuronosyltransferase (UDP グルクロン酸転移酵素)
$V_{\text{max}}$	maximum rate (最大速度)
WME	Williams' media E (ウィリアムズ E 培地)
$d$	deuterium
$f_u$	fraction unbound (蛋白非結合形分率)
$k$	first-order rate constant (一次速度定数)
%RSE	relative standard error of the estimate (相対標準誤差)
$\gamma$	Hill coefficient (ヒル係数)

## 第一章 序論

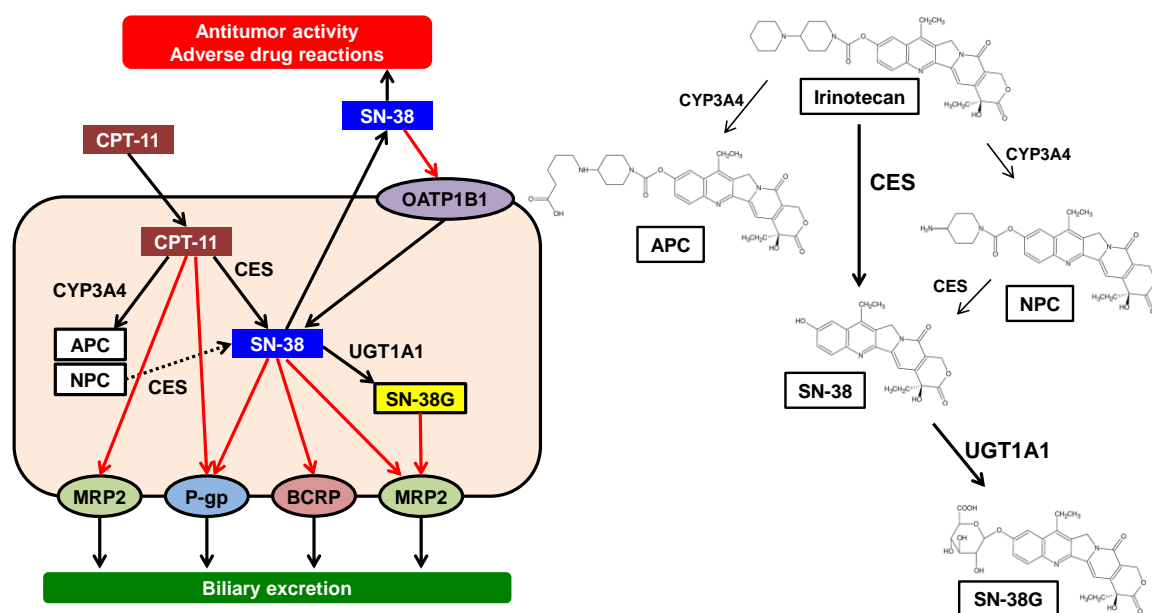
2008 年に米国食品医薬品局（以下 FDA）によって最終化された“Guidance for Industry Safety Testing of Drug Metabolites”，いわゆる MIST ガイダンス<sup>1)</sup> は世界中の製薬企業に大きな影響を与えた。また，日米 EU 医薬品規制調和国際会議（以下 ICH）から発行された ICH-M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」<sup>2)</sup> もほぼ同時期にステップ 5 へ移行した。両ガイダンスは評価対象となる代謝物の存在割合の設定値は異なるが，いずれも医薬品開発における代謝物の安全性評価に関する基準について明確に言及したものであり，製薬企業における薬物動態部門及び安全性部門の業務に大きなインパクトを与えた。更に，FDA，欧州医薬品庁（以下 EMA）及び独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下 PMDA）による薬物間相互作用評価に関するガイダンス/ガイドラインの改訂作業がその後始まり，いずれの当局も一定以上の血中曝露が認められる代謝物に関しては，未変化体と同様に薬物間相互作用のリスク評価を求める記載となっている<sup>3) -5)</sup>。このように，医薬品の安全性を確保することの必要性から，開発段階における代謝物評価の重要性は増しており，*in vitro* 試験系での主代謝経路/主代謝物の評価に加え，生成した代謝物の定量的な *in vivo* 体内動態予測の必要性が高まっている。

生体内における代謝物の生成を考えたとき，その主役を担う臓器は肝臓である。肝臓には数多くの薬物代謝酵素が発現しているが，薬物代謝の観点からはとりわけシトクロム P450（以下 CYP）による酸化的代謝反応（第Ⅰ相解毒）と UDP グルクロン酸転移酵素（以下 UGT）による抱合反応（第Ⅱ相解毒）が，重要である<sup>6) 7)</sup>。これら CYP や UGT はいずれも肝細胞中の粗面小胞体のミクロソーム画分に局在している。このため，薬物代謝が生じるにはまず，薬物が肝細胞内に取り込まれ，細胞内を移動し，粗面小胞体に達する必要がある。また，肝細胞内に取り込まれた薬物の中には，代謝過程を回避して体循環へ移行，あるいは胆汁中に排泄される場合もある。このような過程に含まれる薬物の細胞膜輸送は，単純拡散とトランスポーターが関与する担体介在輸送に大別される。肝臓での薬物等の異物解毒機構は主に第Ⅰ相，第Ⅱ相解毒反応からなる代謝過程として考えられてきたが，最近では薬物の肝細胞への取り込み過程を第Ⅲ相解毒反応，薬物の胆汁中排泄過程を第Ⅳ相解毒反応と呼称するなど<sup>8)</sup>，肝臓全体での代謝と動態を表す機構として認識されている。

薬物の肝臓における消失は肝クリアランスと呼ばれる。肝クリアランスは主に①肝取り込み (basolateral uptake) ②代謝 (intracellular metabolism) ③体循環への移行 (basolateral efflux) ④胆汁中への排泄 (biliary excretion) の 4 因子によって決定される<sup>9)</sup>。薬物の肝動態はこれら 4 因子が複雑に関与している場合が多い。一例として，Ⅰ型 DNA トポイソメラーゼ阻害作用を有する SN-38 を活性本体とする irinotecan (CPT-11) の場合を図 1 に示す<sup>10)</sup>。静脈内

投与された irinotecan は血中から肝臓に取り込まれた後、一部は CYP3A4 によって代謝されるが、大部分はカルボシキルエステラーゼ (CES) によって加水分解を受け、活性本体である SN-38 が肝臓内で生成する。生成した SN-38 は肝臓から体循環に移行し、種々の固形癌及び血液細胞癌に対して有効性を示す。また、血中の SN-38 は受動拡散以外に organic anion transporting polypeptide (以下 OATP) 1B1 等の薬物トランスポーターによって肝臓に取り込まれた後、主に UGT1A1 によってグルクロン酸抱合代謝を受ける。SN-38 やそのグルクロン酸抱合体 (SN-38G) は multidrug resistance-associated protein (以下 MRP) 2, breast cancer resistance protein (以下 BCRP) 等によって胆汁中へ排泄される。このように複数の薬物トランスポーターと薬物代謝酵素の連携によって、irinotecan 及びその代謝物の動態が調節され、薬理作用や副作用が左右されている。

図 1 Hepatic disposition of irinotecan and its metabolites in humans



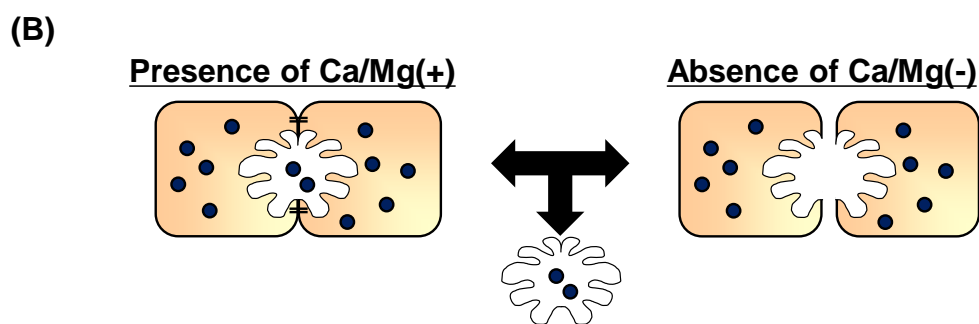
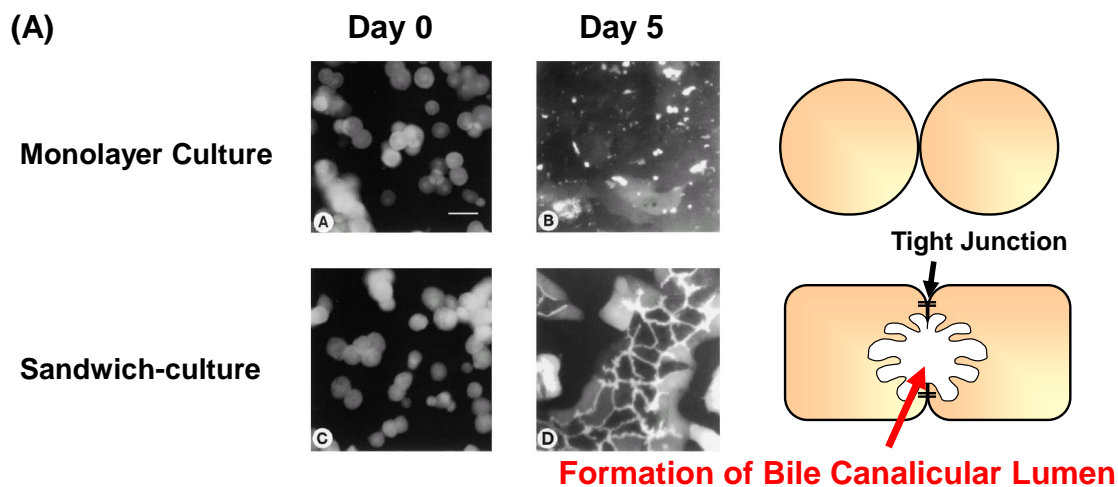
(引用文献 10) を改変)

肝動態を決定する上記 4 因子をそれぞれ評価するために、*in vitro* 試験系が数多く実施されている。中でも薬物代謝に関する *in vitro* 試験系は、肝ミクロソームを代表として医薬品開発に利用できる手法は確立している<sup>11), 12)</sup>。また、肝取り込み過程に関する *in vitro* 試験系の研究も、近年の遺伝子工学や肝細胞の単離調製及び保存技術の発展に伴って進展してきた<sup>13), 14)</sup>。更に、肝細胞は薬物輸送活性並びに薬物代謝酵素活性を網羅的に保持することから、肝細胞を用いて肝取り込みと代謝過程を同時に評価する試験系の研究も行われている<sup>15), 16)</sup>。一方、肝細胞内から細胞外への輸送に関しては、体循環への移行 (basolateral efflux) と胆汁中への排泄 (biliary excretion) を分離評価することが、既存の浮遊肝細胞系や単層培

養肝細胞の試験系では困難とされてきた。このため、これら肝細胞内から肝細胞外への輸送過程を分離評価可能な試験方法の確立が、薬物あるいはその代謝物の肝動態を評価する上で必要とされている。

Collagen-I 等の細胞外マトリクスを被覆した器材に肝細胞を播種し、器材に接着した肝細胞を培養する単層培養法は、40 年近く前から広く *in vitro* 酵素誘導試験等に利用されてきた肝細胞培養法である<sup>17)</sup>。しかし、単層培養法では体循環への移行 (*basolateral efflux*) と胆汁中への排泄 (*biliary excretion*) を分離評価できないため、単層培養法に替わる手法としてサンドイッチ培養法が注目された。サンドイッチ培養法は、Collagen-I 等の細胞外マトリクスを被覆した器材に播種した肝細胞の上に細胞外マトリクスを重層して細胞を培養する手法であり、20 年以上も前に確立された手法である<sup>18),19)</sup>。サンドイッチ培養法は単層培養法と比べて薬物代謝酵素活性を維持できる点や、より長期間細胞を培養できる利点があり、*in vitro* 酵素誘導試験だけでなく、*in vitro* 肝細胞障害性試験や *in vitro* 代謝安定性試験等にも利用される<sup>19)-22)</sup>。更に、単層培養した肝細胞とは異なり、サンドイッチ培養した肝細胞では肝細胞自体の形態がより *in vivo* に近い状態に変化し、細胞間を密着させる *tight junction* が形成されることで、*canalicular network system* が構築される<sup>23)</sup>。この細胞間密着を構成する *tight junction* は、バッファーあるいはメディウム中の  $\text{Ca}^{2+}$  等の二価イオンを除去することによって崩壊させることが出来る<sup>24)</sup>。したがって、**図 2** に示すように、*canalicular network system* を構築したサンドイッチ培養肝細胞を  $\text{Ca}^{2+}$  含有あるいは非含有のバッファー中で反応させることで、毛細胆管腔 (*bile canaliculi lumen*) 中へ移行した化合物を定量できる<sup>25)</sup>。

**図 2 Morphological characteristics of sandwich-cultured hepatocytes and disruption of bile canaliculi by removal of divalent ions**



(引用文献 25) を改変)

サンドイッチ培養肝細胞を用いることで、薬物の胆汁中への排泄過程を肝細胞内から肝細胞外への輸送から分離評価できるようになり、サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁中排泄過程に関する研究が多く検討されるようになった。中でも、化合物の胆汁中排泄クリアランスの予測<sup>26) -28)</sup>、胆汁中への排泄に関与するトランスポーターの同定<sup>29) -31)</sup>、薬物間相互作用<sup>32) -34)</sup>、更に胆汁うっ滞型肝障害の評価<sup>35) -37)</sup>の研究において、本手法が用いられている。また、下記の計算式に示すように、Ca<sup>2+</sup>の有無によって得られる肝細胞及び毛細胆管腔内の化合物の蓄積量 (accumulation) の総和に対する毛細胆管腔内の化合物の蓄積量の割合は biliary excretion index (以下 BEI) と称され、以下の式で表される。

$$BEI (\%) = \frac{Accumulation_{Cell+Bile} - Accumulation_{Cell}}{Accumulation_{Cell+Bile}} \times 100$$

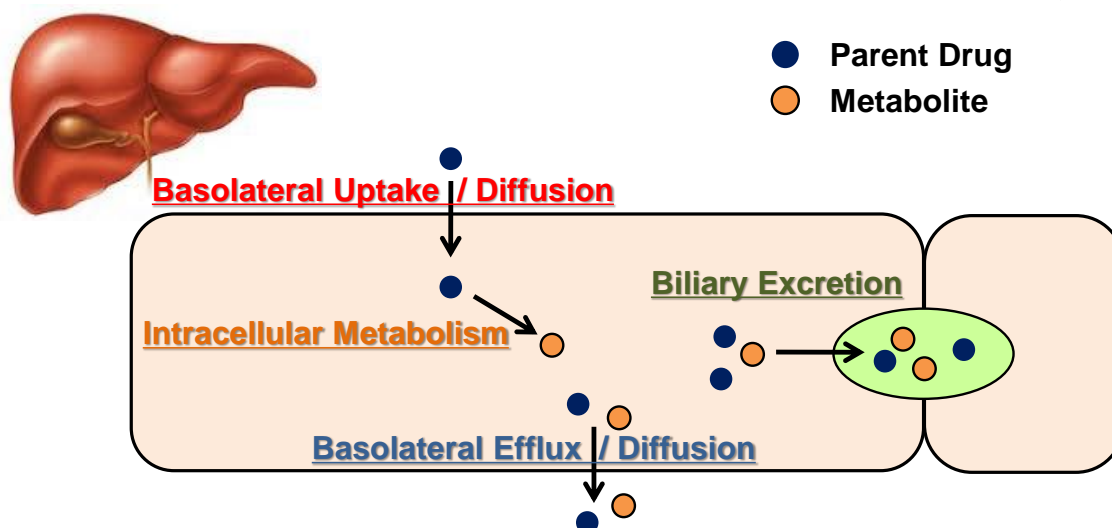
BEI は、化合物の胆汁中排泄の指標として用いられ、本値が大きいほど胆汁中へ排泄され易いと判断される<sup>38) ,39)</sup>。一方、BEI は胆汁中排泄クリアランスとの相関性は低いと報告され



ており<sup>26), 40)</sup>，現在は胆汁中排泄の有無を評価するための定性的な指標と位置付けられている。

前述の通り，MIST ガイダンスあるいは ICH-M3(R2)，並びに薬物間相互作用に関するガイダンス/ガイドラインの発行により，肝臓内で生成した代謝物の体内動態予測が期待される。肝細胞をサンドイッチ培養することで毛細胆管腔が形成され，MRP2 等の胆管側膜トランスポーターによる化合物の胆汁中への排泄を評価できることを先に記した。一方，肝細胞を用いて肝取り込みと代謝過程を同時に評価する研究は，サンドイッチ培養法の確立以前から盛んに行われている。また，サンドイッチ培養肝細胞を用いることで，化合物の肝細胞内から肝細胞外への輸送を体循環への移行（basolateral efflux）と胆汁中への排泄（biliary excretion）の二経路に分離評価可能である。つまり，図 3 に示すように，サンドイッチ培養肝細胞は肝動態を決定する 4 因子全てを同時に評価可能な試験系と考えられる。

図 3 Schema of evaluation of hepatic disposition in sandwich-cultured hepatocytes



最近，このサンドイッチ培養肝細胞の特性を利用した研究，特に薬物代謝酵素とトランスポーターの連携に関係した報告が相次いでいる。例えば，親化合物をサンドイッチ培養肝細胞に添加後の代謝物の BEI 評価<sup>41), 42)</sup>，肝細胞内で加水分解されることでトランスポーターに認識される蛍光基質を用いた胆管側膜トランスポーター活性評価系の構築<sup>43)</sup>，あるいは肝細胞内で生成した代謝物による胆管側膜トランスポーターに対する阻害評価<sup>35), 44), 45)</sup>等が挙げられる。いずれも肝細胞内で生成した代謝物の輸送や肝細胞内での作用を評価したものであるが，一般に酸化的代謝や抱合代謝を受けた代謝物は親化合物に比べて水溶性が増すため，細胞膜の膜透過性が低下する<sup>46)</sup>。このため，代謝物を *in vitro* の細胞系に添加して細胞内での作用を評価する場合は先ず，膜透過過程を考慮する必要がある。また，血中に存在

するエステラーゼによる加水分解を除き、多くの代謝物は細胞内で生成する。このため、代謝物の場合は一度細胞内から体循環へ移行した後、血中濃度に基づいて作用を示すよりはむしろ、細胞内で生成した時点での濃度、すなわち細胞内濃度での作用を考慮の方が妥当と考えられる。このような観点から考えると、サンドイッチ培養肝細胞中の薬物代謝活性を利用した代謝物の輸送や肝細胞内での作用を評価する研究は、肝動態を評価あるいは予測する上で有用である。

世界的に医薬品開発に必要な経費は増加する一方で、新規医薬品の承認数はそれに伴って増加するどころか横ばいあるいは低下傾向にあり、これは医薬品開発における生産性の低下を示す。FDA はこのような背景を憂慮し、2004 年及び 2006 年に相次いで white paper を発行した<sup>47), 48)</sup>。この 2 つの white paper 中で強く述べられていることは、臨床研究における model-based drug development (以下 MBDD) の重要性であり、勘や経験に基づく主観的な予想を、MBDD で得られる客観的、科学的且つ数量的な予測で裏付ける必要性が述べられている。モデリング&シミュレーション (以下 M&S) とは、観測された事象をモデル化して定量的に計算するだけでなく、確率論に基づいてシミュレーションを行い、結果を確率とともに予測する手法である。臨床研究においては、薬物の体内動態、薬物投与に伴うバイオマーカーの変動、更にそのバイオマーカー変動による臨床効果 (薬効あるいは副作用) をモデルとして構築することにより (モデリング)、数学的及び統計的な処理によって未知の結果を予測することが出来る (シミュレーション)<sup>49)</sup>。また、非臨床研究においても systems biology や systems pharmacology といった医薬品開発の初期の段階にも M&S が利用されている<sup>49)</sup>。更に、生理学的薬物動態 (physiologically based pharmacokinetics; 以下 PBPK) モデルに基づいた体内動態変化の予測は、薬物間相互作用評価に関するガイダンス/ガイドラインにも有用性が記載されている<sup>3) -5)</sup>。このように、モデルに基づいた定量的な解析は MBDD の各段階で非常に重要な役割を果たしている。

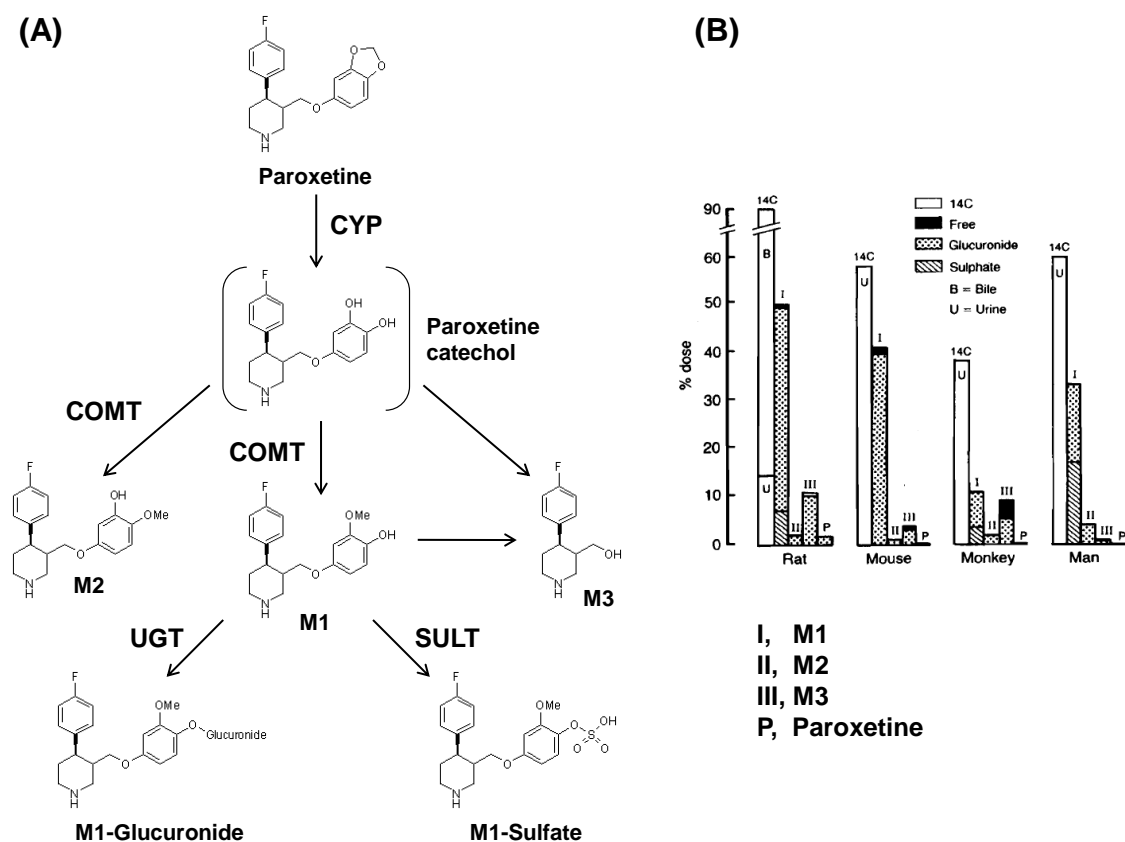
上記のような背景の下、肝動態を決定する 4 因子全てを同時に評価可能なサンドイッチ培養肝細胞中での代謝物の肝動態をモデル化することで、肝臓内で生成した代謝物の体内動態へ応用することを期待して、以下の検討を行った。第二章ではサンドイッチ培養肝細胞における輸送と代謝が *in vivo* を反映しているか否かを評価する目的で、輸送と代謝に種差が存在する paroxetine を用い、サンドイッチ培養肝細胞における輸送と代謝の種差を検討するとともに、代謝物の BEI が血中曝露の指標になり得るか否かを検討した。第三章では代謝物が体循環に多く移行する薬物の肝動態モデリングを目的として、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での mycophenolic acid (以下 MPA) 及びその代謝物の肝動態を数理モデル化し、代謝物の肝動態に影響を及ぼす律速過程をシミュレーションにより検討した。更に第四章では、数学的なモデルを用いた薬物間相互作用の評価を目的として、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中

での MPA と cyclosporin A（以下 CsA）の薬物間相互作用を検討した．第五章では代謝物が体循環へあまり移行しない薬物の肝動態をモデル化することを目的として，サンドイッチ培養ヒト肝細胞での bosentan 及びその代謝物の肝動態をモデル化するとともに，定量的なモデリングによってその存在が示唆された新規代謝経路に関する検討を行った．最後に，結論としてサンドイッチ培養肝細胞中の肝動態モデリングの有用性，及び定量的モデリングに基づく代謝物の血中曝露の指標についてまとめた．

## 第二章 サンドイッチ培養肝細胞を用いた paroxetine の代謝及び輸送の種差

Paroxetine はうつ病を始めとする様々な精神疾患の改善を目的として、世界中で広く使用されている選択的セロトニン再取り込み阻害薬の一つである<sup>50)</sup>。図 4A に示すように、投与された paroxetine は CYP によって化学的に不安定なカテコール体に代謝された後、速やかにカテコール-*O*-メチル転移酵素（以下 COMT）によって水酸基がメチル化された M1 あるいは M2 を生成する。M1 は更に UGT あるいは硫酸転移酵素（以下 SULT）によって抱合代謝を受ける<sup>51) -53)</sup>。図 4B に示すように、ラット、ヒトともに吸収された paroxetine の未変化体としての排泄率は低い。ラットでは投与量の 50%程度が M1 のグルクロン酸抱合体（以下 M1-G）に代謝される一方、M1 の硫酸抱合体（以下 M1-S）の生成量は M1-G に比べて少ない。これに対し、ヒトでは M1-G 及び M1-S の生成量は同程度と、ラットとヒトの間に代謝の種差が存在する。更に、ラットでは胆汁を経て糞中へ排泄される過程が主排泄経路であるのに対し、ヒトでは投与量の 60%程度が代謝物として尿中に排泄される<sup>51)</sup>。つまり、代謝過程のみならず肝細胞内で生成した代謝物の膜輸送過程に関しても、ラットとヒトの間に種差が存在している。

図 4 Metabolic and elimination pathway of paroxetine



(引用文献 51) ~ 53) を改変)

## 第一節 $^3\text{H}$ -Paroxetine の代謝物組成の比較

浮遊肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験は、肝ミクロソームと並んで薬物の代謝安定性評価の標準的な手法である<sup>12)</sup>。一方、サンドイッチ培養肝細胞中の薬物代謝酵素活性は単層培養法と比較すると維持されてはいるが、浮遊肝細胞と比較すると薬物代謝酵素活性の低下が生じ、また薬物代謝酵素毎に長期培養期間中の活性低下速度が異なるとの報告がある<sup>22), 54), 55)</sup>。また前述の通り、paroxetine の代謝には複数の薬物代謝酵素が関与しているため、サンドイッチ培養肝細胞中で得られる代謝物組成が *in vivo* や浮遊細胞中で得られる代謝物組成を反映するかどうか不明である。以上のことから、本節では先ず、ラット及びヒト肝細胞を用い、浮遊肝細胞系あるいはサンドイッチ培養肝細胞系での *in vitro* 代謝試験を行い、両試験系での代謝物組成を検討した。

### 第一項 実験方法

Sprague Dawley 系（以下 SD）ラット凍結肝細胞及びヒト凍結肝細胞は、それぞれ Life Technologies Corporation（Carlsbad, California, 米国）及び BioreclamationIVT（Baltimore, Maryland, 米国）から購入した。Tritium（以下  $^3\text{H}$ ）で標識した paroxetine（以下  $^3\text{H}$ -paroxetine）は PerkinElmer Life and Analytical Sciences（Waltham, Massachusetts, 米国）から購入し、その純度は 95%以上であった。サンドイッチ培養用細胞外マトリクス Geltrex, hepatocyte maintenance supplement 及びウィリアムズ E 培地（以下 WME）は Life Technologies Corporation から購入した。WME は phenol red 不含のものを用い、hepatocyte maintenance supplement を添加して使用した。その他の市販の試薬は等級の高いのものを購入し、使用した。

#### 使用した凍結肝細胞の情報

種	ロット番号	性別	週齢/年齢	詳細
SD ラット	Rs587	雄	7 週齢	4 個体のプール肝細胞
	Rs609	雄	7 週齢	4 個体のプール肝細胞
	Rs616	雄	7 週齢	4 個体のプール肝細胞
ヒト	KQG	女性	38 歳	1 ドナー由来, 白人
	GHA	女性	1 歳	1 ドナー由来, 白人
	RTM	女性	61 歳	1 ドナー由来, 白人

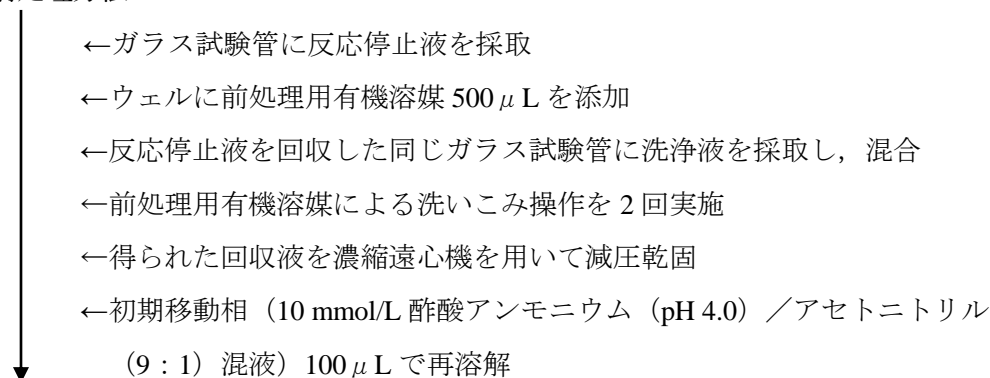
SD ラット及びヒトの凍結肝細胞を 37℃に設定した温浴内で融解後、一部を WME で懸濁し、それぞれ  $6 \times 10^5$  あるいは  $10 \times 10^5$  cells/mL になるよう調整した。予め  $2 \mu\text{mol/L}$   $^3\text{H}$ -paroxetine を含む WME ( $250 \mu\text{L}$ ) を添加した non-coated 24 well plate (BD Biosciences) に、肝細胞懸濁液を同量加えた後（全量： $500 \mu\text{L}$ ）、0.25, 0.5, 1, 2 あるいは 3 時間  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で静置した。

残部の肝細胞は肝細胞播種用培地（Life Technologies Corporation）で懸濁し、それぞれ  $4 \times 10^5$  あるいは  $7 \times 10^5$  cells/mL に調整した。肝細胞懸濁液を collagen I-coated 24 well plate（BioCoat, BD Biosciences）に  $500 \mu\text{L}$  播種した後、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内に静置した。細胞播種から約 4 時間後に  $350 \mu\text{g/mL}$  Geltrex を含む WME に培地を交換し、サンドイッチ培養を行った。以後は約 24 時間毎に WME で培地交換を行い、細胞播種から約 72 時間後に、 $1 \mu\text{mol/L}$   $^3\text{H}$ -paroxetine を含む WME に培地交換し、0.25, 0.5, 1, 3, 6 あるいは 24 時間  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で静置した。

浮遊肝細胞系、サンドイッチ培養肝細胞系ともに所定時間  $^3\text{H}$ -paroxetine を反応させた後、ウェル内に前処理用有機溶媒（アセトニトリル／エタノール／メタノール混液，1 : 1 : 1, vol%）を  $500 \mu\text{L}$  添加し、反応を停止させた。

試料の前処理条件を以下に示す。

#### 前処理方法



再溶解液  $30 \mu\text{L}$  を放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー

（以下 radio-HPLC）で分析

Radio-HPLC システムの制御及びデータ処理には FLO-ONE for Windows version 3.65（Perkin Elmer Life & Analytical Sciences）を使用した。

放射能検出器で検出された 6 秒毎の放射エネルギー（cpm）からクロマトグラムを作成し，paroxetine，M1-G 及び M1-S に相当するピークの割合（% in sample）を求めた。

#### Radio-HPLC 条件

HPLC システム： 1100 series（Agilent Technologies）

カラム： SunFire C18,  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6 \text{ mm ID}$ （Waters）

カラム温度：  $40^\circ\text{C}$

オートサンプラー温度：  $4^\circ\text{C}$

移動相： A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム（酢酸で pH 4.0 に調整）

B) アセトニトリル

Time (min)	% A	% B
0	95	5
5	95	5
10	80	20
20	75	25
35	65	35
55	50	50
65	30	70
65.1	0	100
70	0	100

流速： 1.0 mL/min

検出波長： 230 nm

放射能検出器： Flow Scintillation Analyzer 625TR (Perkin Elmer Life & Analytical Sciences)

シンチレータ： ULTIMA-FLO M (Perkin Elmer Life & Analytical Sciences)

分析時間： 70 min（ポストランは 7 min に設定）

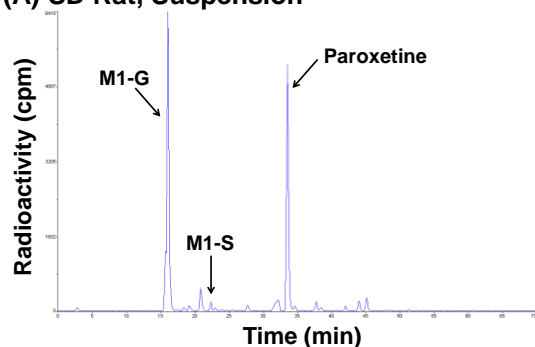
## 第二項 結果

SD ラット及びヒト肝細胞中で  $^3\text{H}$ -paroxetine を代謝させたときの典型的なラジオクロマトグラムを図 5 に、radio-HPLC 分析によって得られた paroxetine, M1-G 及び M1-S の経時的な推移を図 6 に示す。

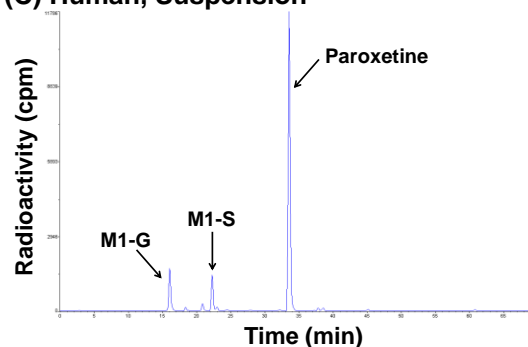
ラット肝細胞中で  $^3\text{H}$ -paroxetine を代謝させたとき、浮遊肝細胞系（図 5A）、サンドイッチ培養系（図 5B）を問わず主代謝物として M1-G が生成した（図 6A 及び B）。 $^3\text{H}$ -Paroxetine をヒト肝細胞中で代謝させたときは、浮遊肝細胞系（図 5C）、サンドイッチ培養系（図 5D）いずれの試験系においても M1-G と M1-S の生成速度は同程度であり、且つ主代謝物であった（図 6C 及び D）。これらの結果はラット、ヒトともに、図 4 に示した *in vivo* の代謝プロファイルを反映したものであった。

**Figure 5** Typical radio-chromatograms of incubation mixture of [ $^3\text{H}$ ]paroxetine with rat or human hepatocytes

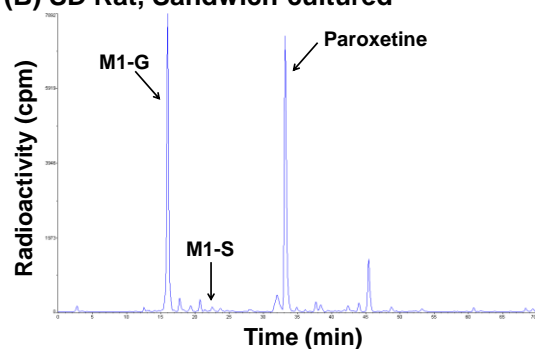
**(A) SD Rat, Suspension**



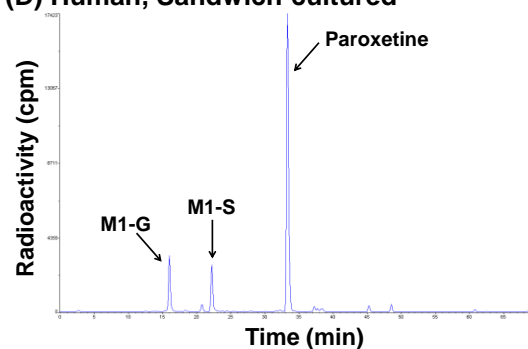
**(C) Human, Suspension**



**(B) SD Rat, Sandwich-cultured**



**(D) Human, Sandwich-cultured**

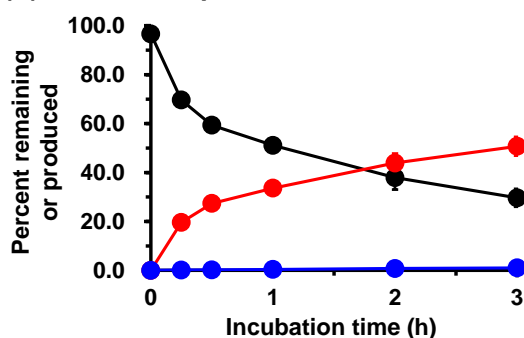


[ $^3\text{H}$ ]Paroxetine (1  $\mu\text{mol/L}$ ) was incubated with rat (A, B) or human (C, D) hepatocytes in suspension for 3 h (A, C) or sandwich-cultured for 24 h (B, D). For sandwich-cultured hepatocytes, hepatocytes were used after 4 days of culture.

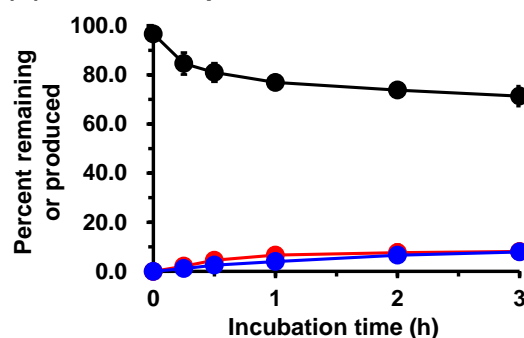


**Figure 6** Disappearance of paroxetine, and appearance of M1-G and M1-S over time from incubation mixture of [ $^3\text{H}$ ]paroxetine with rat or human hepatocytes

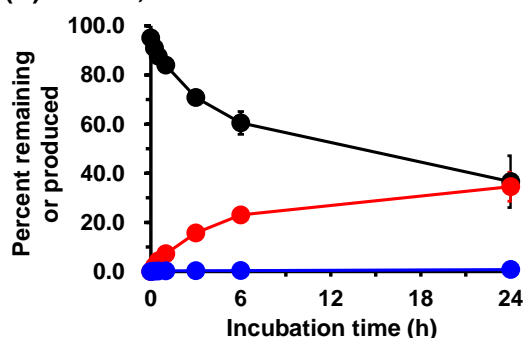
**(A) SD Rat, Suspension**



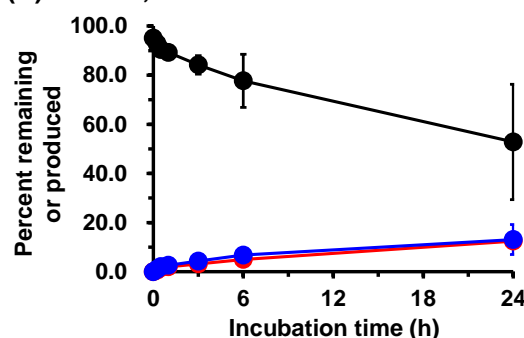
**(C) Human, Suspension**



**(B) SD Rat, Sandwich-cultured**



**(D) Human, Sandwich-cultured**



For sandwich-cultured hepatocytes, hepatocytes were used after 4 days of culture. Metabolite profiles of radioactivity were analyzed by radio-HPLC after the incubation of [ $^3\text{H}$ ]paroxetine (1  $\mu\text{mol/L}$ ) with rat or human hepatocytes for 0.25, 0.5, 1, 2, and 3 h in suspension (A or B, respectively) or 0.25, 0.5, 1, 3, 6, and 24 h in sandwich-culture (C or D, respectively). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of 3 lots of rat or human hepatocytes.

●, percent remaining paroxetine; ●, percent produced M1-G; ●, percent produced M1-S

## 第二節 サンドイッチ培養肝細胞における paroxetine 及び代謝物の毛細胆管腔移行

第二章 第一節の結果から、サンドイッチ培養肝細胞における paroxetine の代謝は *in vivo* での代謝の種差を反映していることが明らかとなった。そこで、ラットあるいはヒトのサンドイッチ培養肝細胞に  $^3\text{H}$ -paroxetine を添加し、paroxetine 及び主代謝物 (M1-G, M1-S) の毛細胆管腔中への移行を検討した。

### 第一項 実験方法

第二章 第一節 第一項に記載した凍結肝細胞及び試薬を用いた。ハanks緩衝液（以下 HBSS）は Life Technologies Corporation から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを購入し、使用した。

第二章 第一節 第一項に準じて、ラットあるいはヒト肝細胞のサンドイッチ培養を行った。細胞播種から約 72 時間後、 $1\ \mu\text{mol/L}$   $^3\text{H}$ -paroxetine を含む WME に培地を交換した。0.25, 0.5, 1, 4 あるいは 24 時間  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で静置した後、培地を除去し、Ca/Mg(+)バッファ（HBSS(Ca/Mg+) containing 20 mM HEPES）あるいはCa/Mg(-)バッファ（HBSS(Ca/Mg-) containing 20 mM HEPES and 1 mM EGTA）を添加して更に 5 分間  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で静置した。バッファを除去した後、前処理用有機溶媒（アセトニトリル／エタノール／メタノール混液、1 : 1 : 1, vol%）を添加し、反応を停止させた。前処理方法及び radio-HPLC 条件は第二章 第一節 第一項に準じた。また、分析試料の一部は液体シンチレーションカウンター（Perkin Elmer Life & Analytical Sciences）を用いて放射エネルギーの測定に供した。

放射能検出器で検出された 6 秒毎の放射エネルギー (cpm) からクロマトグラムを作成し、paroxetine, M1-G 及び M1-S に相当するピークの割合 (% in sample) を求めた。また、ピークの割合、分析試料の放射エネルギー及び比活性から、各試料中の paroxetine, M1-G 及び M1-S の蓄積量 (accumulation, pmol/well) を算出した。BEI は以下の計算式から算出した。

$$\text{BEI (\%)} = \frac{\text{Accumulation}_{\text{Cell+Bile}} - \text{Accumulation}_{\text{Cell}}}{\text{Accumulation}_{\text{Cell+Bile}}} \times 100$$

### 第二項 統計解析

Ca/Mg(+)と Ca/Mg(-)条件下における paroxetine, M1-G, M1-S それぞれの蓄積量について、paired t 検定を行った。有意水準は 5%とし、統計解析には SAS version 9.2 (SAS Institute Inc.) を用いた。

### 第三項 結果

サンドイッチ培養によって毛細胆管腔を形成させたラットあるいはヒト肝細胞に  $^3\text{H}$ -paroxetine を添加し、肝細胞中及び毛細胆管腔中の paroxetine, M1-G 及び M1-S 蓄積量の経時的な推移を検討した。その結果を図 7 に示す。また、得られた蓄積量から算出した BEI を表 1 に示す。なお、サンドイッチ培養ラット肝細胞中での M1-S の生成量は僅かであったため、ラットでは M1-S の蓄積量及び BEI を算出できなかった。

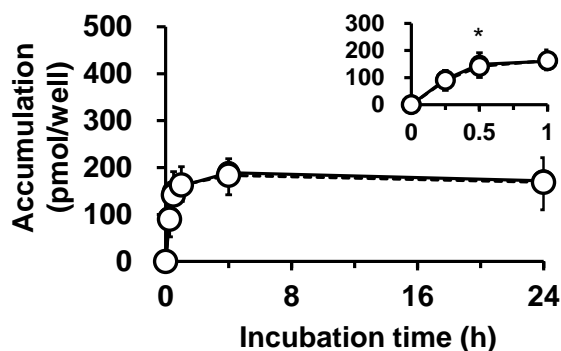
サンドイッチ培養ラット肝細胞に  $^3\text{H}$ -paroxetine を添加したとき、M1-G の蓄積量は添加後 30 分に最大値を示した (図 7C)。M1-G の BEI は  $^3\text{H}$ -paroxetine 添加後 15 分では 50.9%、添加後 30 分では 25.8%と比較的高い値を示した後、蓄積量の推移と同じように低下した。一方、paroxetine の蓄積量は添加後 1~4 時間で最大値を示した (図 7A)。添加後 30 分において、Ca/Mg(+)条件下における蓄積量は Ca/Mg(-)条件下よりも有意に高値を示したが、他の時点では有意な差は認められず、またいずれの時点においても BEI は 10%未満であった。このことから、paroxetine はラットではほとんど胆汁中排泄されないものと考えられた。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に  $^3\text{H}$ -paroxetine を添加したとき、M1-G の蓄積量は添加後 30 分に最大値を示し (図 7D)、BEI は添加後 15 分で 15.1%、添加後 30 分では 16.7%であった。また、M1-S の蓄積量は添加後 15~60 分に最大値を示し (図 7E)、BEI は添加後 15 分、30 分及び 60 分でそれぞれ 19.0%、16.4%及び 29.1%と M1-G の BEI と同程度の値を示した。一方で、paroxetine についてはラットと同様に添加後 30 分を除いて Ca/Mg(+)と Ca/Mg(-)条件下ではほとんど差が認められず (図 7B)、BEI も低かった。このことから、ラットと同様に、ヒトでも paroxetine はほとんど胆汁中排泄されないものと考えられた。

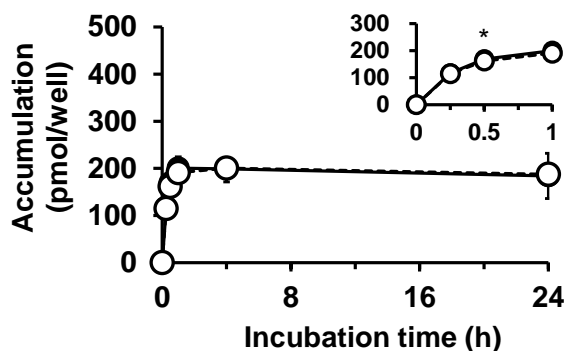
以上の結果から、paroxetine は胆管側膜を介して毛細胆管腔中へ移行しない一方、M1-G 及び M1-S は胆管側膜を介して毛細胆管腔中へ移行していることが示唆された。

图 7 Accumulation-time profiles of paroxetine, M1-G, and M1S in rat or human sandwich-cultured hepatocytes.

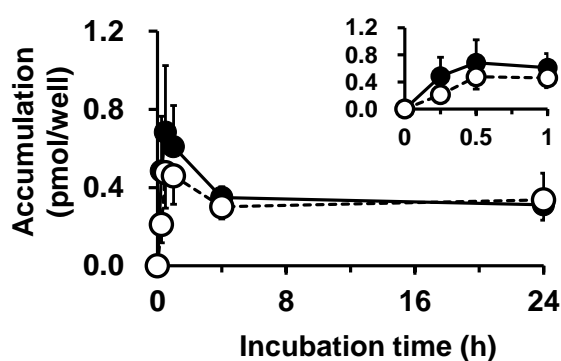
(A) Rat, Paroxetine



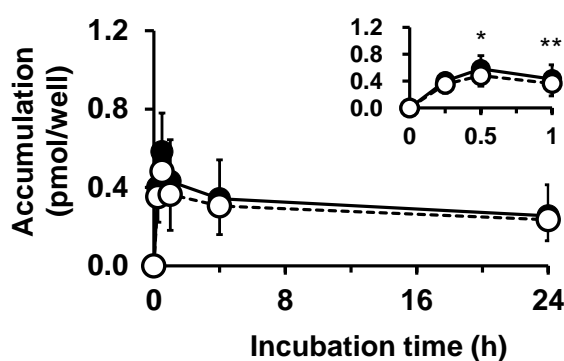
(B) Human, Paroxetine



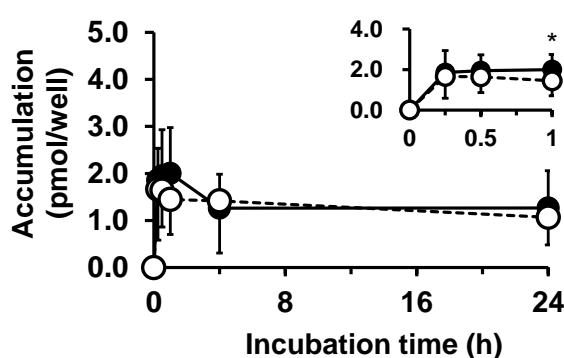
(C) Rat, M1-G



(D) Human, M1-G



(E) Human, M1-S



Hepatocytes were used after 4 days of culture. Metabolite profiles of radioactivity were analyzed by radio-HPLC after the incubation of [ $^3\text{H}$ ]paroxetine (1  $\mu\text{mol/L}$ ) with rat or human sandwich-cultured hepatocytes for 0.25, 0.5, 1, 4, and 24 h. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of 3 lots of rat or human hepatocytes.

●, Ca/Mg(+)-treatment (cells + bile); ○, Ca/Mg(-)-treatment (cells)

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  significant for Ca/Mg(+)- versus Ca/Mg(-)-treatment (paired t-test)

**表 1 BEIs of paroxetine, M1-glucuronide and M1-sulfate in rat and human sandwich-cultured hepatocytes**

Species	Incubation time (h)	BEI (%)		
		Paroxetine	M1-G	M1-S
SD Rat	0.25	5.1 ± 6.7	50.9 ± 25.7	NC
	0.5	4.9 ± 0.9	25.8 ± 18.1	
	1	2.6 ± 3.5	21.9 ± 18.0	
	4	4.9 ± 4.3	13.5 ± 12.7	
	24	4.5 ± 7.8	1.4 ± 1.4	
Human	0.25	2.4 ± 3.9	15.1 ± 20.2	19.0 ± 20.9
	0.5	4.2 ± 1.5	16.7 ± 5.5	16.4 ± 14.3
	1	4.7 ± 3.4	15.6 ± 2.3	29.1 ± 9.9
	4	0.6 ± 0.7	8.7 ± 8.3	7.8 ± 13.6
	24	0.0 ± 0.0	6.9 ± 11.9	13.3 ± 11.5

BEI was calculated after [<sup>3</sup>H]paroxetine (1 μmol/L) was incubated with rat or human sandwich-cultured hepatocytes for indicated time. Data are expressed as mean ± S.D. of 3 lots of rat or human hepatocytes. Data were assumed to be zero in calculating mean and S.D. when the individual BEI was a negative value.

NC, not calculated

### 第三節 M1-G 及び M1-S のトランスポーター基質評価

第二章 第二節の結果から、paroxetine の主代謝物 M1-G 及び M1-S はサンドイッチ培養肝細胞の胆管側膜を介して毛細胆管腔中へ移行していることが示唆された。そこで、胆管側膜側に発現している ATP-binding cassette (以下 ABC) トランスポーターである MRP2, BCRP あるいは bile salt export pump (以下 BSEP) を発現させた膜ベシクルを用い、これら ABC トランスポーターに対する M1-G 及び M1-S の基質認識性を検討した。

#### 第一項 実験方法

ヒト MRP2, ヒト BCRP, ヒト BSEP, ラット Mrp2, ラット Bcrp 及びラット Bsep を過剰発現させた膜ベシクルは株式会社ジェノメンブレン (横浜) から購入し、購入後速やかに使用した。雄 SD ラット肝臓ホモジネート 9000g 上清 (以下肝 S9, 400 個体のプール) 及びヒト肝サイトゾール (50 ドナーのプール, mixed gender) は XENOTECH LLC (Lenexa, Kansas, 米国) から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを購入し、使用した。

$^3\text{H}$ -M1-G 及び  $^3\text{H}$ -M1-S は市販品がなかったため、以下の方法により酵素的に調製した。すなわち、CYP の補酵素として nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (以下 NADPH), COMT の補酵素として S-(5'-adenosyl)-L-methionine (以下 SAM), UGT の補酵素として UDP グルクロン酸 (以下 UDPGA) を添加した雄 SD ラット肝 S9 (2 mg/mL) 中で、 $^3\text{H}$ -paroxetine (10  $\mu\text{mol/L}$ ) を 37°C で一晩代謝させた後、HPLC を用いて M1-G の溶出フラクションを回収し、OASIS HLB (Waters) を用いた固相抽出方法によって  $^3\text{H}$ -M1-G を得た。 $^3\text{H}$ -M1-S の場合は先ず、NADPH 及び SAM を添加した雄 SD ラット肝 S9 (2 mg/mL) 中で、 $^3\text{H}$ -paroxetine (10  $\mu\text{mol/L}$ ) を 37°C で一晩代謝させた後、HPLC を用いて M1 の溶出フラクションを回収した。OASIS HLB を用いた固相抽出法によって  $^3\text{H}$ -M1 を得た後、SULT の補酵素として adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (以下 PAPS) を添加したヒト肝サイトゾール (1 mg/mL) 中で  $^3\text{H}$ -M1 を一晩代謝させた。HPLC を用いて M1-S の溶出フラクションを回収し、OASIS HLB を用いた固相抽出方法によって  $^3\text{H}$ -M1-S を得た。調製した  $^3\text{H}$ -M1-G,  $^3\text{H}$ -M1-S の放射化学的純度はいずれも 95% 以上であることを確認した後、実験に使用した。

ABC トランスポーター発現膜ベシクルを用いた *in vitro* 取り込み試験は rapid filtration 法を用いた。補酵素として adenosine 5'-triphosphate (以下 ATP) を添加したヒトあるいはラットの各 ABC トランスポーター (MRP2/Mrp2, BCRP/Bcrp あるいは BSEP/Bsep) 発現膜ベシクルに、 $^3\text{H}$ -M1-G あるいは  $^3\text{H}$ -M1-S を添加し、37°C で 10, 30, 60 あるいは 120 秒間取り込みを行った。所定時間後、5 倍量の反応停止液中に反応液を添加することで反応を停止させ、速やかに 0.45  $\mu\text{m}$  の membrane filter (Millipore) に添加した。氷冷した反応停止液で 5 回 membrane filter を洗浄した後、液体シンチレーションカウンター用バイアルに membrane

filter を採取した．液体シンチレータを加えて溶解させた後，液体シンチレーションカウンタを用いて試料中放射エネルギーの測定した．なお， $^3\text{H-M1-G}$  及び  $^3\text{H-M1-S}$  の反応液中濃度はいずれも  $0.5 \mu\text{mol/L}$  とし，発現膜ベシクルの反応液中濃度はいずれも  $1 \text{ mg/mL}$  とした．また，ATP の代わりに adenosine 5'-monophosphate (以下 AMP) を補酵素として添加したものを対照試料とした．

分析試料の放射エネルギー，比活性及び反応液中膜ベシクル濃度から，各試料中の  $^3\text{H-M1-G}$  及び  $^3\text{H-M1-S}$  の発現膜ベシクルへの取り込み量 (uptake, pmol/mg protein) を算出した．

#### バッファの組成

内容	組成
<i>In vitro</i> 代謝 ( $^3\text{H-M1-G}$ 調製)	100 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.4) , 5 mM 塩化マグネシウム, 1 mM NADPH, 1 mM SAM, 5 mM UDPGA, $25 \mu\text{g/mL}$ アラメチシン
<i>In vitro</i> 代謝 ( $^3\text{H-M1}$ 調製)	100 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.4) , 5 mM 塩化マグネシウム, 1 mM NADPH, 1 mM SAM
<i>In vitro</i> 代謝 ( $^3\text{H-M1-S}$ 調製)	100 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.4) , 5 mM 塩化マグネシウム, 0.6 mM PAPS
<i>In vitro</i> 取り込み (MRP2/Mrp2)	50 mM MOPS-Tris バッファ (pH 7.0) , 7.5 mM 塩化マグネシウム, 70 mM 塩化カリウム, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP) , 2 mM グルタチオン
<i>In vitro</i> 取り込み (BCRP/Bcrp)	50 mM MOPS-Tris バッファ (pH 7.0) , 7.5 mM 塩化マグネシウム, 70 mM 塩化カリウム, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP)
<i>In vitro</i> 取り込み (BSEP/Bsep)	10 mM HEPES-Tris バッファ (pH 7.4) , 10 mM 硝酸マグネシウム, 100 mM 硝酸カリウム, 50 mM スクロース, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP)

#### 反応停止液の組成

内容	組成
<i>In vitro</i> 取り込み (MRP2/Mrp2)	40 mM MOPS-Tris バッファ (pH 7.0) , 70 mM 塩化カリウム
<i>In vitro</i> 取り込み (BCRP/Bcrp)	
<i>In vitro</i> 取り込み (BSEP/Bsep)	10 mM HEPES-Tris バッファ (pH 7.4) , 100 mM 硝酸カリウム, 50 mM スクロース

## 第二項 統計解析

$^3\text{H-M1-G}$ ,  $^3\text{H-M1-S}$  それぞれの AMP 添加試料に対する ATP 添加試料の取り込み量について，2-sample t 検定を行った．有意水準は 5% とし，統計解析には SAS version 9.2 を用いた．

## 第三項 結果

$^3\text{H-M1-G}$  の各 ABC トランスポーター発現膜ベシクルへの取り込み量を **図 8** に示す．

$^3\text{H-M1-G}$  は ATP 存在下のヒト MRP2 及びラット Mrp2 発現膜ベシクルへ時間依存的に取り込まれた (**図 8A** 及び **B**) ．一方，ATP 存在下のヒト BCRP 及びラット Bcrp 発現膜ベシ

クルへの  $^3\text{H-M1-G}$  の取り込み量は、添加後 1 分において対照試料である AMP 添加群に比べて有意な差が認められたものの、他の時点では有意な差は認められず、また、経時的な取り込みも認められなかった（図 8C 及び D）。更に、ヒト BSEP 及びラット Bsep 発現膜ベシクルへの  $^3\text{H-M1-G}$  の取り込み量は、いずれの時点においても ATP と AMP 間で有意な差は認められなかった（図 8E 及び F）。これらのことから、M1-G はヒト、ラットともに胆管側膜側に発現している MRP2/Mrp2 によって、胆汁中へ排泄されると考えられた。

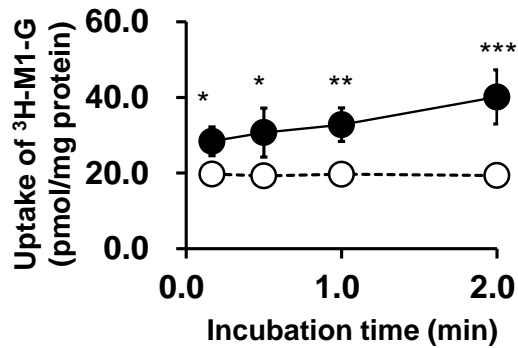
$^3\text{H-M1-S}$  の各 ABC トランスポーター発現膜ベシクルへの取り込み量を図 9 に示す。

$^3\text{H-M1-S}$  については、いずれの ABC トランスポーター発現膜ベシクルへの有意な取り込みは認められなかった。

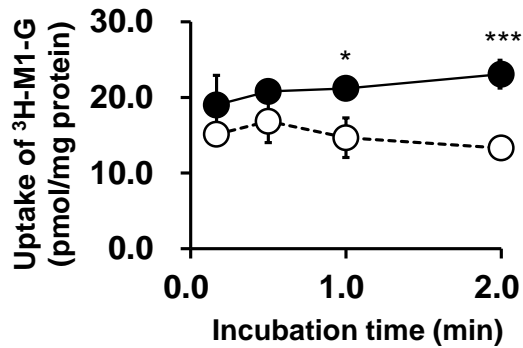


Figure 8 Transport-time profiles of  $^3\text{H}$ -M1-G into rat or human ABC transporter-expressing membrane vesicles

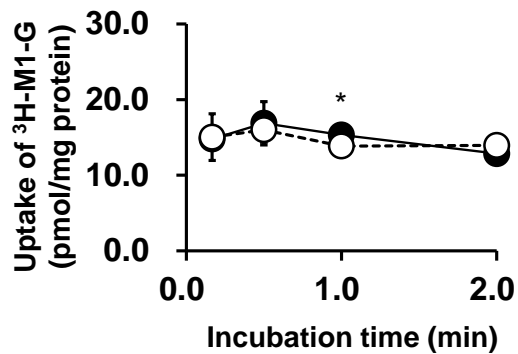
(A) Rat Mrp2



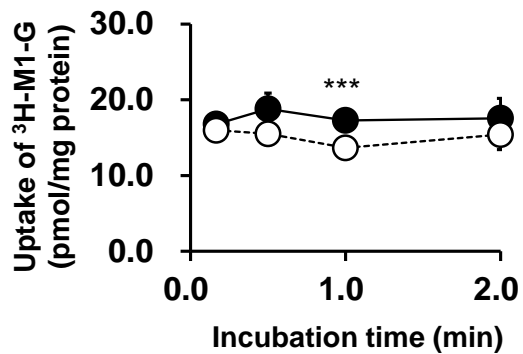
(B) Human MRP2



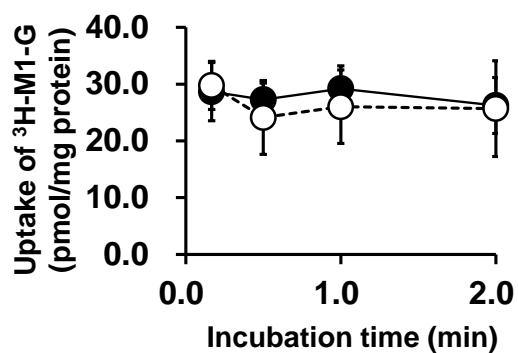
(C) Rat Bcrp



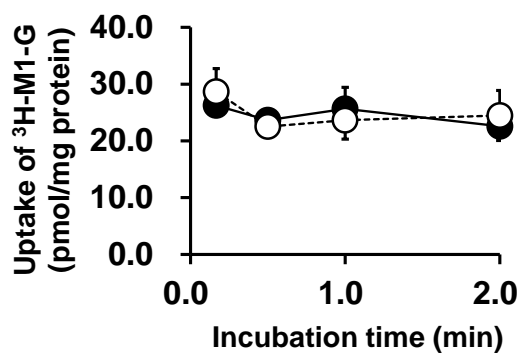
(D) Human BCRP



(E) Rat Bsep



(F) Human BSEP



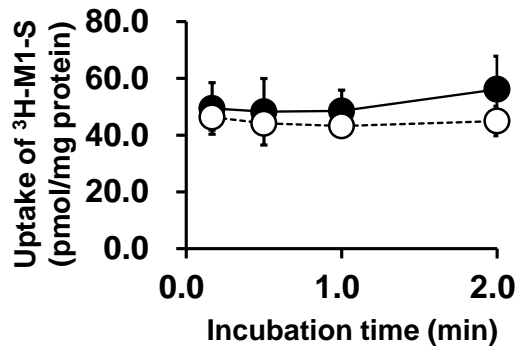
Radioactivity in membrane vesicles was determined by liquid scintillation counting after the incubation of  $^3\text{H}$ -M1-G (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) with 1 mg/mL rat Mrp2 (A), human MRP2 (B), rat Bcrp (C), human BCRP (D), rat Bsep (E), or human BSEP (F) transporter-expressing membrane vesicles over 2 min. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of independent 3 determinations.

●, 4 mM ATP; ○, 4 mM AMP

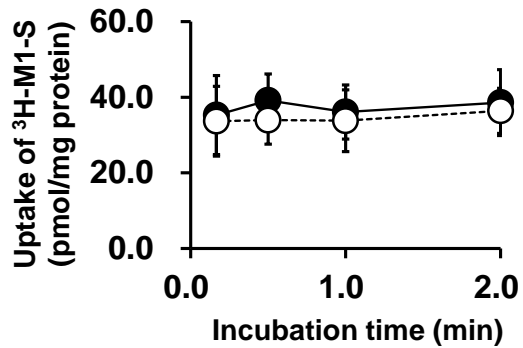
\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  significant for ATP versus AMP added (2-sample t-test)

Figure 9 Transport-time profiles of  $^3\text{H}$ -M1-S into rat or human ABC transporter-expressing membrane vesicles

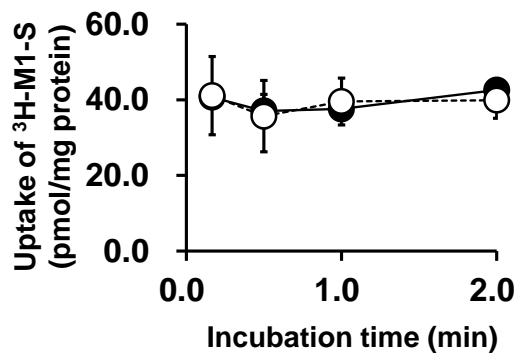
(A) Rat Mrp2



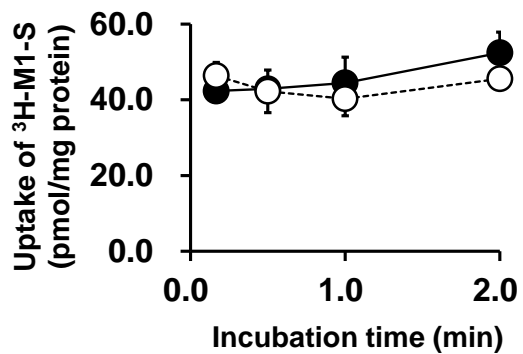
(B) Human MRP2



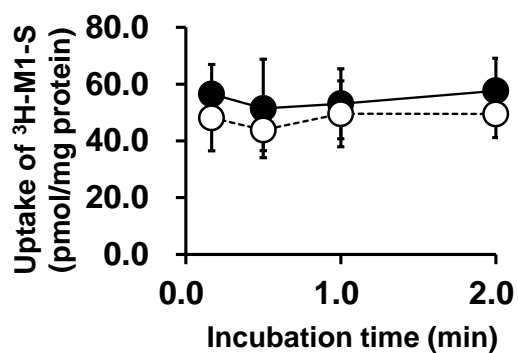
(C) Rat Bcrp



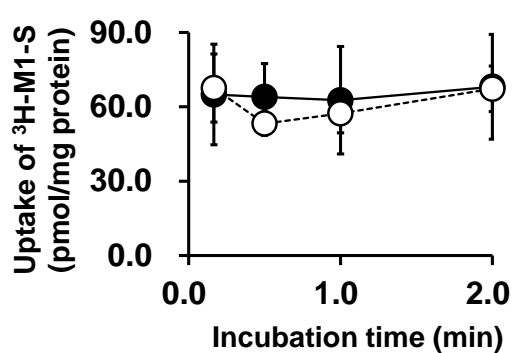
(D) Human BCRP



(E) Rat Bsep



(F) Human BSEP



Radioactivity in membrane vesicles was determined by liquid scintillation counting after the incubation of  $^3\text{H}$ -M1-S ( $0.5 \mu\text{mol/L}$ ) with  $1 \text{ mg/mL}$  rat Mrp2 (A), human MRP2 (B), rat Bcrp (C), human BCRP (D), rat Bsep (E), or human BSEP (F) transporter-expressing membrane vesicles over 2 min. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of independent 3 determinations.

●, 4 mM ATP; ○, 4 mM AMP

#### 第四節 小括

ラットとヒトの間に輸送と代謝の種差が存在する paroxetine をモデル薬物として、サンドイッチ培養肝細胞中での  $^3\text{H}$ -paroxetine の代謝を評価した。その結果、ラット、ヒトともにサンドイッチ培養肝細胞中での  $^3\text{H}$ -paroxetine の代謝物組成は浮遊肝細胞系と類似しており、ラットでは M1-G が主代謝物として、ヒトでは M1-G とともに M1-S が主代謝物として認められた。この結果は *in vivo* の代謝プロファイル<sup>51)</sup> と相関するものであった。Paroxetine のように複数の薬物代謝酵素 (CYP, COMT, UGT, SULT) が代謝に関与する化合物を用い、浮遊肝細胞系とサンドイッチ培養肝細胞における代謝比較を行った報告はこれまでになく、本結果はサンドイッチ培養肝細胞を用いた代謝物評価の有用性を高めるものである。一方、サンドイッチ培養中の肝細胞における薬物代謝活性はある程度維持されてはいるが、浮遊細胞系と比較すると低下する傾向が認められた。反応に用いた肝細胞数及び最大反応時間における paroxetine の残存率、あるいは M1-G 又は M1-S の生成率から求めた両試験系間の代謝活性の差は約 7~12 倍と、浮遊肝細胞系の方がサンドイッチ培養肝細胞よりも高く、この差はこれまでに報告されている代謝活性の差<sup>56)</sup> と同程度であった。この結果は、現状のサンドイッチ培養肝細胞の培養方法では培養期間中に薬物代謝活性が低下することを示すものである。一方、浮遊肝細胞系では細胞生存率が数時間以内に急激に低下することが報告されており<sup>23) 57)</sup>、代謝固有クリアランスの小さい化合物の場合はむしろ長時間の反応が可能なサンドイッチ培養肝細胞の方が有用との報告もある<sup>56) 58)</sup>。サンドイッチ培養法には薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現量の維持等、更に改良が必要である。今後培養方法が更に改善され、*in vivo* の肝細胞の活性を高く維持できるサンドイッチ培養法が確立されることが期待される。

ABC トランスポーター発現膜ベシクルを用いた検討から、M1-G はラット、ヒトともに Mrp2/MRP2 の基質であることが明らかとなった。ヒト MRP2 をコードする遺伝子 *ABCC2* には輸送活性が変動する遺伝子多型が複数報告されており<sup>59)</sup>、これら遺伝子多型を有するヒトでは M1-G の体内動態が変化している可能性がある。このため、M1-G と *ABCC2* 遺伝子多型に関する更なる検討が期待される。

サンドイッチ培養肝細胞における M1-G の BEI は、添加後 1 時間までの値で比較すると、ラットの方がヒトよりも高い傾向が認められた。ラットでは投与量の約 50% が M1-G に代謝された後、そのほとんどが胆汁中に排泄される一方、ヒトでは投与量の約 60% が M1-G を含む代謝物として尿中に排泄される<sup>51)</sup>。ある一定以上の分子量になると、化合物は胆汁中に排泄されやすくなること、及びその分子量の閾値は種間で異なることが経験的に報告されている。その閾値となる分子量はラットでは  $325 \pm 50 \text{ g/mol}$ 、ヒトでは  $500 \pm 50 \text{ g/mol}$  であり、それ以上の化合物は胆汁中に排泄されやすい傾向がある<sup>60) 61)</sup>。また、分子量依存的な

胆汁中排泄機構として、MRP2/Mrp2 及び BCRP/Bcrp が一部、関与しているとの報告もある<sup>62), 63)</sup>。M1-G の分子量は約 500 g/mol であり、ラットでは経験的な分子量の閾値 ( $325 \pm 50$  g/mol) をはるかに超えている一方で、ヒトでは上記に示した閾値 ( $500 \pm 50$  g/mol) に近い。このため、ラットとヒトにおける M1-G の胆汁中排泄の種差は、分子量に基づく Mrp2/MRP2 の種差が関与している可能性が考えられた。

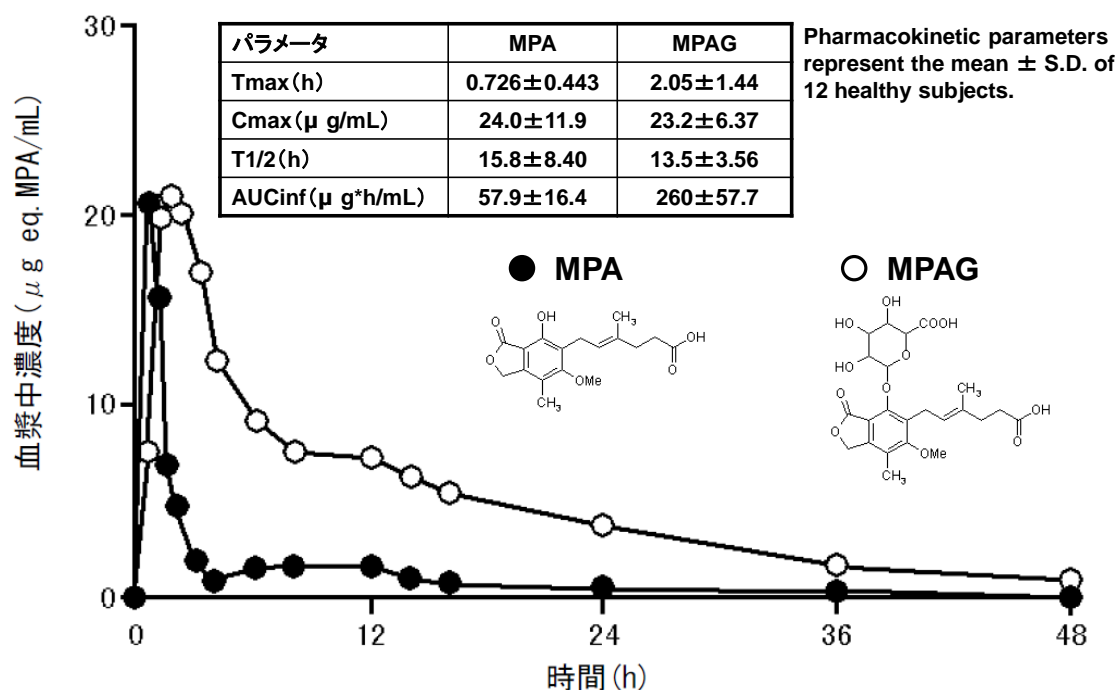
Paroxetine の BEI は時点を問わず、ラット、ヒトともに 10%未満であった。この結果は投与された paroxetine は代謝によって主に消失し、未変化体としては尿中あるいは胆汁中にほとんど排泄されない *in vivo* の結果<sup>51)</sup> を反映しているものと考えられた。一方、M1-S のサンドイッチ培養ヒト肝細胞における BEI は、ヒトの M1-G の BEI と同程度であり、また、ABC トランスポーター発現膜ベシクルを用いた検討では、いずれの ABC トランスポーターに対しても基質認識性がなかった。Paroxetine 投与後に生成した M1-G や M1-S は主に尿中に排泄されるヒトでの結果<sup>51)</sup> から、肝細胞内で生成した M1-G や M1-S の一部は胆汁中に排泄されている可能性はあるが、その大部分は胆汁中ではなく体循環へ移行し、尿中へ排泄されていると考えられる。本研究では肝細胞内で生成した代謝物の体循環への移行を予測することを目的としているが、BEI はあくまで胆汁中排泄の有無を評価するための定性的な指標とされている<sup>39)</sup>。Paroxetine のように非常に低い BEI を示す場合は、胆汁中排泄過程を無視出来るすことが可能な一方、その数値の大きさを基準に、肝細胞内から体循環への移行を予測することは困難と考えられた。

以上をまとめると、サンドイッチ培養肝細胞における輸送と代謝は *in vivo* を反映している結果が得られた。一方、サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁中排泄過程に関する既存の評価方法（蓄積量、BEI 評価）では、肝細胞内から体循環へ移行する過程を十分に評価あるいは予測に利用できなかった。このため、肝細胞内で生成した代謝物の体循環への移行を予測するために、肝細胞及び毛細胆管腔中の代謝物だけでなく、バッファー中に移行した代謝物も測定する必要があると考えられた。また、バッファー中、肝細胞中、及び毛細胆管腔中の化合物の推移は経時的に変化するため、BEI のような時点毎の指標ではなく、速度論に基づいた数学的なモデル解析が必要と考えられた。

### 第三章 MPA 及び代謝物の肝動態モデリング

イノシンーリン酸脱水素酵素（以下 IMPDH）に対して阻害作用を有する mycophenolic acid (MPA) は、プロドラッグ（モフェチル型エステル体）あるいは腸溶性製剤として経口投与され、その代謝拮抗作用から移植後の免疫抑制療法や様々な免疫疾患に対する治療を目的として、世界中で広く使用されている<sup>64), 65)</sup>。MPA は主に肝臓で UGT によるグルクロン酸抱合を受ける<sup>66), 67)</sup>。MPA の主代謝物であるフェノールグルクロニド（以下 MPAG）は、IMPDH に対する阻害作用は有していない一方、量的に少ない代謝物である MPA のアシルグルクロニド（以下 AcMPA）は、MPA と同程度の IMPDH 阻害活性を有する<sup>68), 69)</sup>。MPAG 及び AcMPA は胆汁中に排泄された後<sup>70), 71)</sup>、消化管内で腸内細菌によって脱抱合を受け、MPA として再吸収される。これら一連の MPA のグルクロン酸抱合体の腸肝循環によって、血漿中 MPA 濃度が維持される<sup>72), 73)</sup>。一方、ヒトにおいては投与された MPA の 90%以上が最終的に MPAG として尿中に排泄される。また、**図 10** に示すように、MPA と MPAG の血漿中濃度推移を比較すると、MPA よりも MPAG の血中曝露が約 4 倍高い<sup>64), 74), 75)</sup>。つまり、肝細胞内で生成した MPAG は胆管側膜を介して胆汁中に排泄されるとともに、血液側膜を介して体循環にも多く移行する代謝物と考えられる。

**図 10 Plasma concentration–time profiles of MPA and MPAG after single oral administration of 1000 mg MPA-mofetil to healthy subjects**



（引用文献 75）を改変）

## 第一節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞における MPAG の肝取り込み及び胆汁中排泄

前述の通り、肝細胞内で生成した MPAG は胆管側膜を介して胆汁中に排泄されと考えられる。また、ヒト血漿中 MPAG 濃度は MPA と比較して高く、最終的には尿中に投与量の 90%以上が MPAG として排泄される。つまり、肝細胞内で生成した MPAG は胆管側膜を介して胆汁中に排泄されるとともに、血管側膜を介して体循環にも多く移行する代謝物と考えられる。このことから、肝臓で代謝を受けた後、生成した代謝物が体循環へ多く移行する薬物として MPA を選択し、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での肝動態を検討することとした。また、体循環へ移行した MPAG の一部は肝臓に取り込まれた後、胆汁中に排泄され、腸肝循環を受けると考えられる。このため、本節では先ずサンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて、MPAG の肝取り込み過程及び胆汁中排泄過程の検討を行った。

### 第一項 実験方法

ヒト凍結肝細胞は BioreclamationIVT から購入した。MPAG 及びその重水素体（以下 *d* 体）は Toronto Research Chemicals Inc. (North York, カナダ) から購入した。蛋白定量に用いた BCA protein assay kit は Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois, 米国) から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを購入し、使用した。

#### 使用した凍結肝細胞の情報

ロット番号	性別	週齢/年齢	詳細
IZT	女性	44 歳	1 ドナー由来, 白人
GHA	女性	1 歳	1 ドナー由来, 白人
RTM	女性	61 歳	1 ドナー由来, 白人

サンドイッチ培養法は第二章 第一節 第一項に準じた。

肝取り込み過程の検討の場合は、細胞播種から約 72 時間後、WME から Ca/Mg(+)バッファに交換し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 5 分間プレインキュベーションした。次いで 1, 3, 10, 30, 100, 300 あるいは 1000  $\mu$ mol/L の MPAG を含有した Ca/Mg(+)バッファ（300  $\mu$ L）に交換した。2 分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した後、バッファを除去した。速やかに氷冷した Ca/Mg(+)バッファで 2 回洗浄した後、エタノールを添加して反応を停止させた。エタノールを加温によって除去した後、2%ラウリル硫酸ナトリウム（以下 SDS）を 100  $\mu$ L 添加し、細胞を溶解後、水 200  $\mu$ L を加えて細胞溶解液を得た。

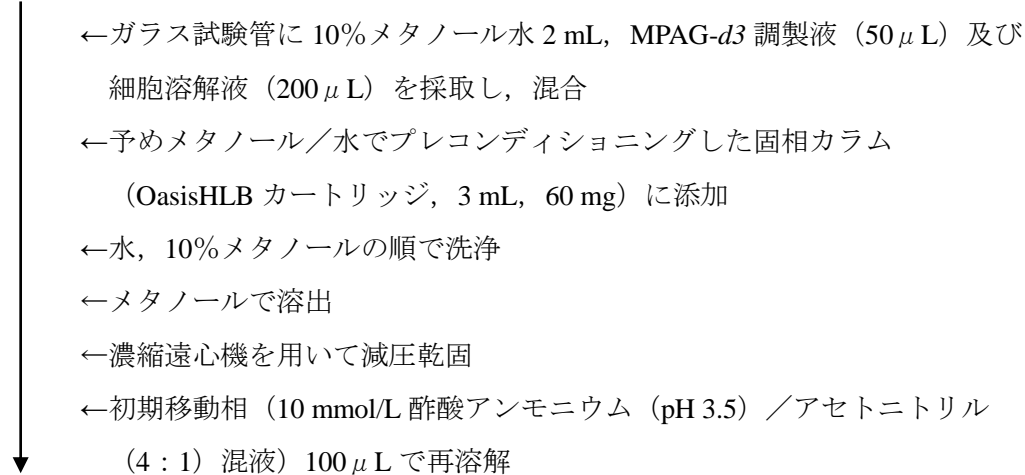
胆汁中排泄過程の検討の場合は、細胞播種から約 72 時間後、WME から Ca/Mg(+)バッファあるいは Ca/Mg(-)バッファに交換し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 5 分間プレインキュベーションした。次いで 1  $\mu$ mol/L MPAG を含むそれぞれ対応するバッファ（300  $\mu$ L）に交換し、3, 5 あるいは 10 分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。所定時間 MPAG を反応させた後、バッファを回収し、速やかに氷冷したそれぞれ対応するバッファで 2 回洗

浄後，エタノールを添加して反応を停止させた．エタノールを加温によって除去した後，2%SDS を 100  $\mu$  L 添加し，細胞を溶解後，水 200  $\mu$  L を加えて細胞溶解液を得た．

細胞溶解液 25  $\mu$  L を用い，BCA protein assay kit を用いて蛋白定量を行った．定量方法は製造元が発行したプロトコールに準じた．

試料の前処理条件を以下に示す．

#### 前処理方法



再溶解液 10  $\mu$  L を液体クロマトグラフィータンデム型質量分析（以下 LC-MS/MS）で分析  
液体クロマトグラフィー質量分析（以下 LC-MS）システムの制御及びデータ処理には  
Analyst version 1.4.1（AB Sciex）を使用した．検量線範囲は 5～1000 nmol/L とし，検量線試  
料及び quality control（以下 QC）試料が以下の基準を満たした測定バッチを採用とした．

- ・ 検量線試料の各濃度における真度が 100.0 $\pm$ 15.0%以内（定量下限では $\pm$ 20.0%以内）であること．
- ・ 検量線の真度が上記の基準を満たさなかった濃度は，原則としてそれを除いて再度検量線を作成して評価すること．
- ・ 検量線用標準試料の 75%以上かつ少なくとも 6 濃度の試料が上記の基準を満たすこと．
- ・ QC 試料の各濃度における真度が 100.0 $\pm$ 15.0%以内であること．
- ・ QC 試料の 2/3 以上かつ各濃度の 1/2 以上の QC 試料が上記の基準を満たすこと．

#### LC-MS/MS 条件

HPLC システム： 1100 series  
カラム： SunFire C18, 3.5  $\mu$  m, 100 $\times$ 2.1 mm ID（Waters）  
カラム温度： 40 $^{\circ}$ C  
オートサンプラー温度： 4 $^{\circ}$ C

移動相： A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.5)

B) アセトニトリル

Time (min)	% A	% B
0	80	20
10	40	60
11	40	60
12	80	20
18	80	20

流速： 250  $\mu$  L/min

Ion source： Turbo Spray

Scan type： MRM

Scan time： 250 msec

Polarity： Negative

Analyte	monitor ion ( $m/z$ )	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
MPAG	495.2 $\rightarrow$ 319.2	-85	-30	-9
MPAG- $d_3$	498.3 $\rightarrow$ 322.1	-65	-32	-13

細胞溶解液中 MPAG 濃度及び蛋白濃度から、蓄積量 (accumulation, pmol/mg protein) を算出した。BEI の算出は第二章 第二節 第一項に準じた。

肝取り込み過程の検討において、飽和性の取り込み過程に対するミカエリス定数 (以下  $K_m$ ) 及び最大速度 (以下  $V_{max}$ )、並びに非飽和性の取り込み過程を示す単純拡散 (以下  $P_{dif}$ ) を以下の計算式から求めた。

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} + P_{dif} \times [S]$$

ここで、 $v$  は各濃度における MPAG の蓄積量、 $[S]$  は MPAG の添加濃度を示す。また、取り込み固有クリアランス (以下  $CL_{uptake,int}$ ) はロット毎に  $V_{max}$  を  $K_m$  で除して算出した。パラメータの算出には Phoenix<sup>®</sup> WinNonlin<sup>®</sup> version 6.1 (Pharsight Corporation as part of Certara) を用いた。

## 第二項 統計解析

第二章 第二節 第二項に準じ、Ca/Mg(-)条件下に対する Ca/Mg(+)条件下の MPAG の蓄積量について、paired t 検定を行った。

## 第三項 結果

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に 1~1000  $\mu$  mol/L の MPAG を添加し、濃度依存的な肝取り込み過程の検討を行った。得られた蓄積量から算出したパラメータを表 2 に示す。



MPAG のサンドイッチ培養ヒト肝細胞への取り込み過程に関して、飽和性の取り込み過程における  $K_m$  は  $72 \mu\text{mol/L}$ 、 $V_{\max}$  は  $409 \text{ pmol/2min/mg protein}$  と推定された。 $K_m$  及び  $V_{\max}$  から算出された  $CL_{\text{uptake,int}}$  ( $8.38 \mu\text{L/2min/mg protein}$ ) は  $P_{\text{dif}}$  ( $23.4 \mu\text{L/2min/mg protein}$ ) の約 1/3 であり、MPAG の肝取り込み過程における飽和性の取り込み、すなわち肝取り込みトランスポーターの関与は約 1/4 程度であることが示唆された。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に  $1 \mu\text{mol/L}$  の MPAG を添加後の MPAG 蓄積量の経時的な推移を図 11 に示す。

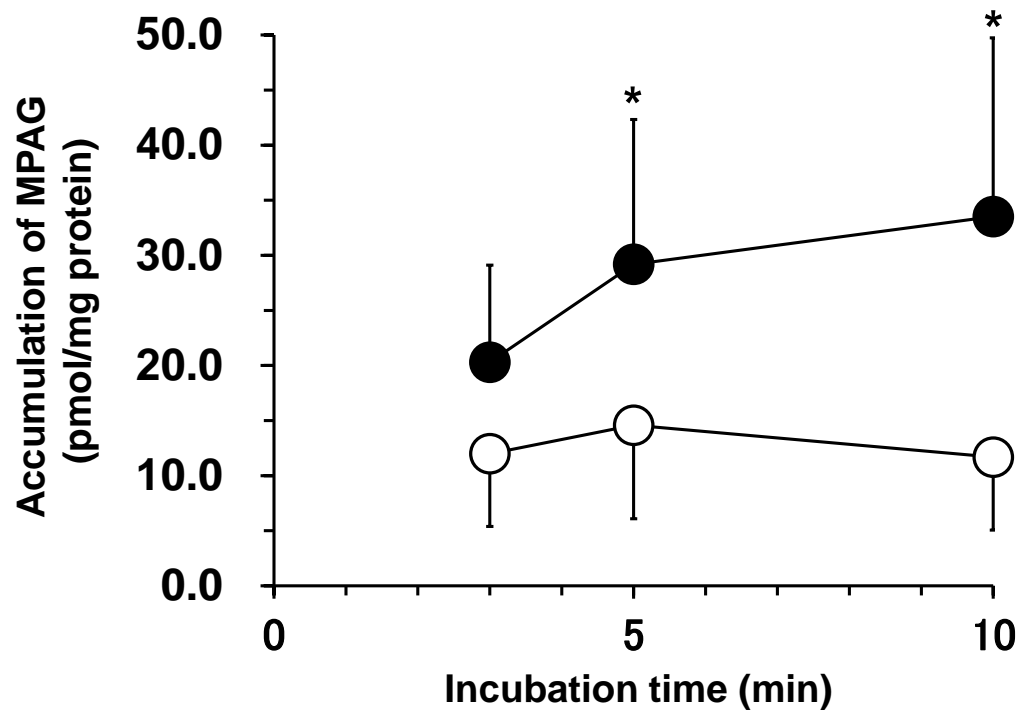
サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPAG を添加したとき、毛細胆管腔中の MPAG は経時的に増加した。添加後 3、5 及び 10 分における MPAG の BEI は、それぞれ 43.9%、52.5% 及び 64.4% であった。このことから、肝細胞内に取り込まれた MPAG は良好に毛細胆管腔中に移行すると考えられた。

**表 2 Kinetic parameters of uptake process of MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes**

Kinetic parameter	Estimated value		
$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	72.0	$\pm$	48.4
$V_{\max}$ ( $\text{pmol/2min/mg protein}$ )	409	$\pm$	180
$CL_{\text{uptake,int}}$ ( $\mu\text{L/2min/mg protein}$ )	8.38	$\pm$	6.13
$P_{\text{dif}}$ ( $\mu\text{L/2min/mg protein}$ )	23.4	$\pm$	14.3

$K_m$ ,  $V_{\max}$ , and  $P_{\text{dif}}$  were estimated after 1–1000  $\mu\text{mol/L}$  MPAG was incubated with sandwich-cultured human hepatocytes for 2 min. Data represents mean  $\pm$  S.D. of 3 lots of human hepatocytes.

☒ 11 Accumulation–time profiles of MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes



Sandwich-cultured human hepatocytes were incubated with 1  $\mu\text{mol/L}$  MPAG for 3, 5, or 10 min in  $\text{Ca}^{2+}(+)$  or  $\text{Ca}^{2+}(-)$  buffer. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three lots of human hepatocytes.

●,  $\text{Ca}^{2+}(+)$  buffer; ○,  $\text{Ca}^{2+}(-)$  buffer

\*  $p < 0.05$  for  $\text{Ca}^{2+}(+)$  versus  $\text{Ca}^{2+}(-)$  conditions (paired t test)

## 第二節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での MPA 及び MPAG の肝動態

第二章 第四節で述べたように、肝細胞内で生成した代謝物の体循環への移行を評価するためには、肝細胞中、毛細胆管腔中だけでなく、バッファー中の代謝物も測定する必要があると考えられた。そこで、サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPA を添加後のバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の経時的な MPA 及び MPAG の量的推移を検討した。

### 第一項 実験方法

第三章 第一節 第一項に記載したヒト凍結肝細胞（ロット IZT）及び蛋白定量キットを使用した。MPA 及びその *d* 体は Toronto Research Chemicals Inc. から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを購入し、使用した。

細胞播種から約 72 時間後、WME から Ca/Mg(+)バッファーあるいは Ca/Mg(-)バッファーに交換し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 5 分間プレインキュベーションした。次いで 1  $\mu$  mol/L MPA を含むそれぞれ対応するバッファー（300  $\mu$  L）に交換し、1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 あるいは 45 分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。所定時間 MPA を反応させた後のバッファーを回収後、氷冷したそれぞれ対応するバッファーで 2 回洗浄し、エタノールを添加して反応を停止させた。エタノールを加温によって除去した後、2%SDS を 100  $\mu$  L 添加し、細胞を溶解後、水 200  $\mu$  L を加えて細胞溶解液を得た。

蛋白定量法は第三章 第一節 第一項に準じた。

試料の前処理条件を以下に示す。

#### 前処理方法

- ←ガラス試験管に 10%メタノール水 2 mL, MPA-*d*3 調製液（50  $\mu$  L）, MPAG-*d*3 調製液（50  $\mu$  L）及び細胞溶解液又はバッファー（200  $\mu$  L）を採取し、混合
- ←予めメタノール／水でプレコンディショニングした固相カラム（OasisHLB カートリッジ, 3 mL, 60 mg）に添加
- ←水, 10%メタノールの順で洗浄
- ←メタノールで溶出
- ←濃縮遠心機を用いて減圧乾固
- ←初期移動相（10 mmol/L 酢酸アンモニウム（pH 3.5）／アセトニトリル（4 : 1）混液）100  $\mu$  L で再溶解

再溶解液 10  $\mu$  L を LC-MS/MS で分析

LC-MS システムの制御及びデータ処理には Analyst version 1.4.1 を使用した。検量線範囲は MPA, MPAG とともに 5~1000 nmol/L とした。第三章 第一節 第一項に準じて検量線試料及び QC 試料の判定を行った。

## LC-MS/MS 条件

HPLC システム : 1100 series  
カラム : SunFire C18, 3.5  $\mu$  m, 100 $\times$ 2.1 mm ID (Waters)  
カラム温度 : 40°C  
オートサンプラー温度 : 4°C  
移動相 :

A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.5)

B) アセトニトリル

Time (min)	% A	% B
0	80	20
10	40	60
11	40	60
12	80	20
18	80	20

流速 : 250  $\mu$  L/min

Ion source : Turbo Spray

Scan type : MRM

Scan time : 250 msec

Polarity : Negative

Analyte	monitor ion ( $m/z$ )	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
MPA	319.2 $\rightarrow$ 275.2	-80	-24	-7
MPA- $d_3$	322.1 $\rightarrow$ 278.2	-95	-26	-7
MPAG	495.2 $\rightarrow$ 319.2	-85	-30	-9
MPAG- $d_3$	498.3 $\rightarrow$ 322.1	-65	-32	-13

細胞溶解液中 MPA あるいは MPAG 濃度と蛋白定量値から、蓄積量 (accumulation, pmol/mg protein) を算出した。また、バッファー及び細胞溶解液濃度から、バッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPA 及び MPAG 量を求めた。第二章 第二節 第一項に準じて BEI を算出した。

## 第二項 統計解析

第二章 第三節 第二項に準じて、Ca/Mg(-)条件下に対する Ca/Mg(+)条件下の MPA あるいは MPAG の蓄積量について、2-sample t 検定を行った。

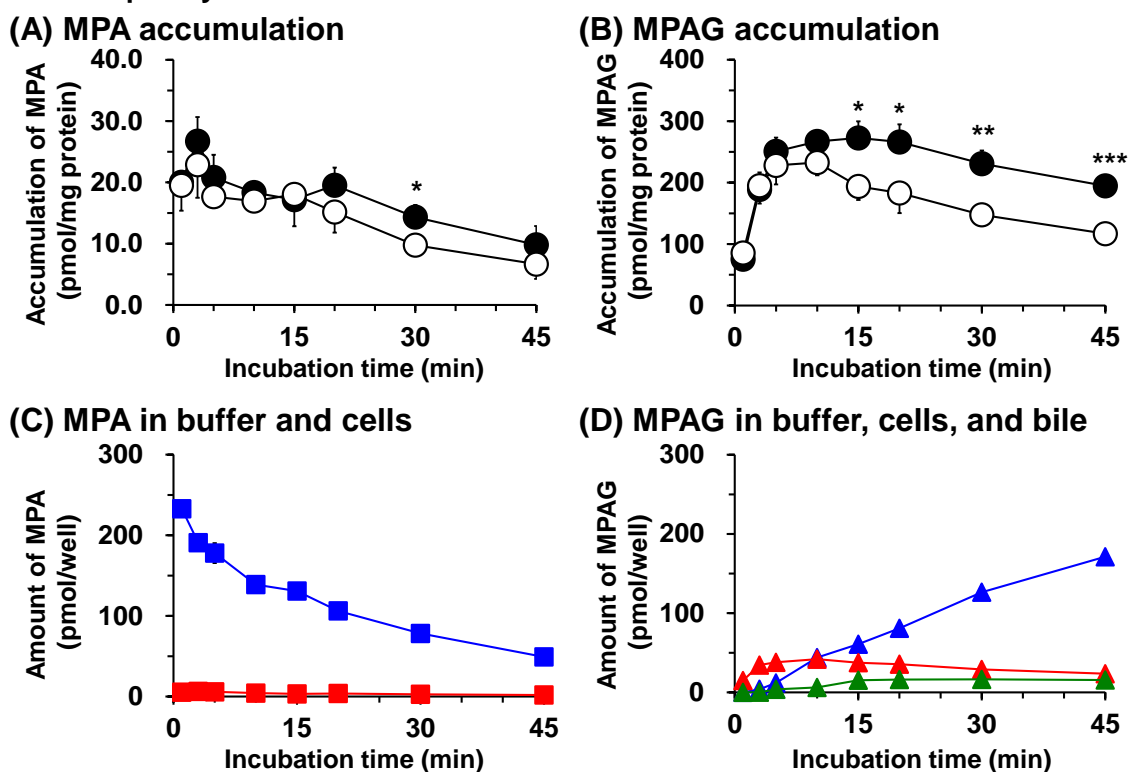
### 第三項 結果

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に  $1\mu\text{mol/L}$  の MPA を添加後の経時的な MPA 及び MPAG の量的推移を図 12 に示す。また、MPA 及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞内で生成した MPAG の BEI を表 3 に示す。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPA を添加したとき、肝細胞内での MPAG 量は MPA に比べて約 10 倍高かった (図 12A 及び B)。このことから、肝細胞内に取り込まれた MPA は速やかに UGT によって MPAG に代謝されと考えられた。添加後 30 分における Ca/Mg(+)条件下での MPA の蓄積量は Ca/Mg(-)条件下よりも有意に高かったが、その他の時点では有意な差は認められず、また、Ca/Mg(-)条件下とほぼ同じ推移を示した (図 12A)。このことから、MPA の胆汁中への排泄はほとんどないと考えられた。一方、MPA 添加後に肝細胞内で生成した MPAG の蓄積量は添加後 15 分以降、Ca/Mg(-)条件下よりも Ca/Mg(+)条件下で有意に高く推移した (図 12B)。MPA の BEI には時間依存性が認められなかったが、MPAG の BEI は時間とともに上昇した。このことから、肝細胞内で生成した MPAG も良好に毛細胆管腔中へ移行していると考えられた。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に添加後のバッファー中 MPA は経時的に減少し (図 12C)、バッファー中 MPAG は経時的に増加した (図 12D)。また、MPA 添加後 15 分以降は、肝細胞中あるいは毛細胆管腔中の MPAG よりもバッファー中の MPAG の方が高く推移した。このことは、肝細胞内で生成した MPAG は胆管側膜を介して毛細胆管腔へ移行するとともに、血液側膜を介してバッファー中へ移行していることを示唆するものであった。

☒ 12 Accumulation or mass–time profiles of MPA and MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes



(A) and (B) show MPA and formed MPAG accumulation–time profiles, respectively, after incubating sandwich-cultured human hepatocytes with 1  $\mu\text{mol/L}$  MPA over 45 min in  $\text{Ca}^{2+}(+)$  or  $\text{Ca}^{2+}(-)$  buffer. (C) and (D) shows MPA and MPAG mass balance–time profiles in the buffer, hepatocytes, and bile canaliculi, respectively, after incubating sandwich-cultured human hepatocytes with 1  $\mu\text{mol/L}$  MPA over 45 min. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments with one lot of human hepatocytes (Lot IZT).

●,  $\text{Ca}^{2+}(+)$  buffer; ○,  $\text{Ca}^{2+}(-)$  buffer

■, MPA in buffer; ■, MPA in hepatocytes;

▲, MPAG in buffer; ▲, MPAG in hepatocyte; ▲, MPAG in bile canaliculi

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  for  $\text{Ca}^{2+}(+)$  versus  $\text{Ca}^{2+}(-)$  conditions (2-sample t test)

**表 3 BEIs of MPA and formed MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes**

Incubation time (min)	BEI (%)	
	MPA	MPAG
1	2.5	0.0
3	14.4	0.0
5	15.0	9.1
10	7.6	12.8
15	0.0	28.9
20	22.3	31.2
30	32.0	36.1
45	32.1	40.0

BEI was calculated after incubating sandwich-cultured human hepatocytes with 1  $\mu\text{mol/L}$  MPA from the mean accumulation of three independent experiments using Lot IZT. BEI was assumed to be zero if the difference between Ca/Mg(+) and Ca/Mg(−) conditions was negative.

### 第三節 MPAG の輸送に関与する MRPs の同定

第三章 第二節の結果から、MPAG の肝細胞内からバッファー中への移行に、トランスポーターが介在する可能性が考えられた。ヒトでは MPAG の胆汁中排泄に MRP2 が関与していると報告されていることから<sup>76), 77)</sup>、胆管側膜に発現している MRPs として MRP2 及び MRP8<sup>78)</sup> を、血液側膜に発現している MRPs として MRP3 及び MRP4 に着目し、それらトランスポーターの関与の可能性について検討することとした。これら MRP を過剰発現させた膜ベシクルを用い、MPAG の輸送活性を検討し、基質として認識された MRP2, MRP3 及び MRP4 に関して、親和性を見積もるための濃度依存性試験を行った。

#### 第一項 実験方法

ヒト MRP2, MRP3, MRP4 あるいは MRP8 を過剰発現させた膜ベシクルは株式会社ジェノメンブレンから購入し、購入後速やかに使用した。その他の試薬は市販の等級の高いものを使用した。

膜ベシクルを用いた rapid filtration 法は第二章 第三節 第一項に準じた。基質認識性の検討の場合、反応液中の MPAG 濃度は  $10\ \mu\text{mol/L}$  とし、反応時間は 5 分とした。濃度依存的な取り込み試験の場合、MPAG 濃度は 10, 30, 100, 200, 500 あるいは  $1000\ \mu\text{mol/L}$  とし、反応時間は取り込み量の直線性が認められた時間、すなわち MRP3 膜ベシクルの場合は 0.5 分、MRP2 及び MRP4 の場合は 2 分に設定した。いずれの検討においても膜ベシクルの反応液中濃度は  $0.5\ \text{mg/mL}$  とし、氷冷した反応停止液で 5 回洗浄後の membrane filter は測定に供するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。


#### バッファー及び反応停止液の組成

内容	組成
バッファー	50 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 7.5 mM 塩化マグネシウム, 70 mM 塩化カリウム, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP) , 2 mM グルタチオン
反応停止液	40 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 70 mM 塩化カリウム



試料の前処理条件を以下に示す.

#### 前処理方法

- 
- ←Membrane filter をアセトニトリル (250  $\mu$  L) で溶解
  - ←メタノール (250  $\mu$  L) 及び MPAG-*d3* 調製液 (50  $\mu$  L) を添加し,  
membrane filter を析出させた後, 遠心 (約 10000g, 5 分)
  - ←遠心上清をガラス試験管に採取し, 水 5 mL で希釈
  - ←予めメタノール/水でプレコンディショニングした固相カラム  
(Oasis HLB カートリッジ, 3 mL, 60 mg) に添加
  - ←水, 10%メタノールの順で洗浄
  - ←メタノールで溶出
  - ←濃縮遠心機を用いて減圧乾固
  - ←初期移動相 (10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.5) /アセトニトリル  
(4 : 1) 混液) 100  $\mu$  L で再溶解

再溶解液 10  $\mu$  L を LC-MS/MS で分析

LC-MS システムの制御及びデータ処理には Analyst version 1.4.1 を使用した. 検量線範囲は 10~2000 nmol/L とした. **第三章 第一節 第一項**に準じて, 検量線試料及び QC 試料の判定及び LC-MS/MS 測定を行った.

試料中 MPAG 濃度及び反応液中膜ベシクル濃度から, 取り込み量 (uptake, pmol/mg protein) を算出した.

濃度依存的な取り込み試験において,  $K_m$  及び  $V_{max}$  を以下の計算式から求めた.

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

ここで,  $v$  は各濃度における MPAG の時間あたりの取り込み量,  $[S]$  は MPAG の添加濃度を示す. パラメータの算出には GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software) を用いた.

#### 第二項 統計解析

基質認識性評価における AMP 添加試料に対する ATP 添加試料の MPAG の取り込み量について, **第二章 第三節 第二項**に準じた 2-sample t 検定を行った.

### 第三項 結果

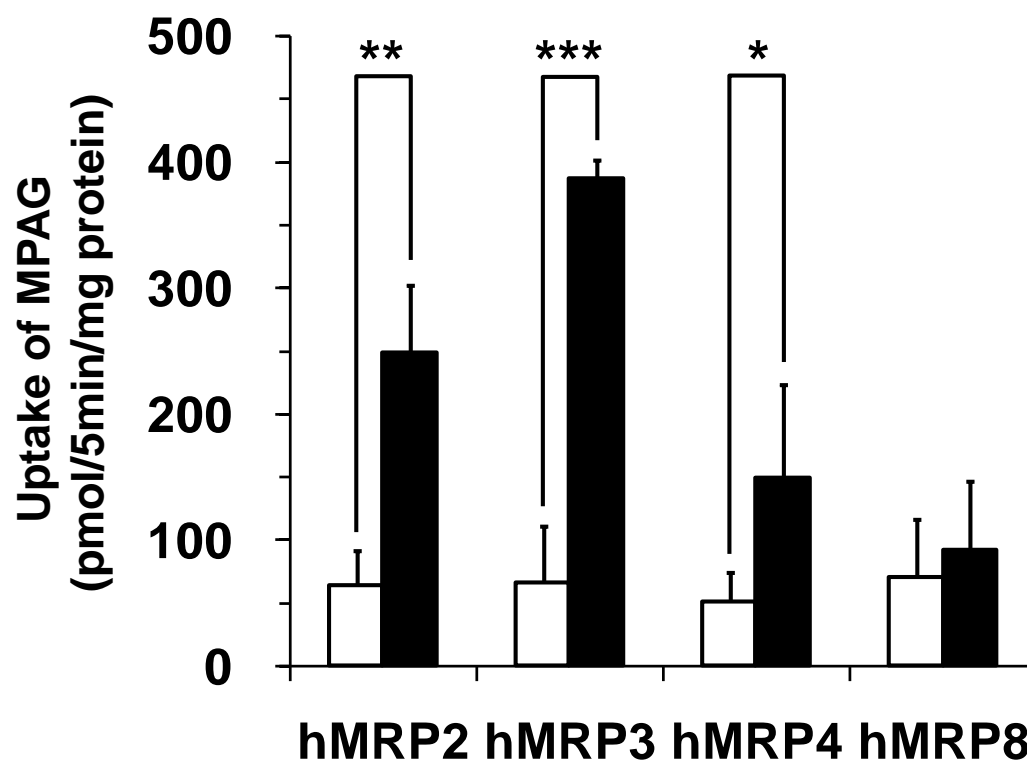
肝臓に発現しているヒト MRPs に対する MPAG の基質認識性について、各 MRP 発現膜ベシクルと  $10\ \mu\text{mol/L}$  の MPAG を ATP あるいは AMP 存在下、 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間の取り込みを行った。その結果を図 13 に示す。

ヒト MRP8 発現膜ベシクルへの MPAG の取り込み量は、ATP と AMP 存在下間で変わらなかった。一方、ヒト MRP2, MRP3 あるいは MRP4 を過剰発現させた膜ベシクルへの MPAG の取り込み量は、ATP 存在下で有意に高かった。このことから、MPAG はヒト MRP2, MRP3 及び MRP4 の基質であると判断した。

基質として認められた MRPs に対する  $K_m$  及び  $V_{\max}$  算出のために、 $10\sim 1000\ \mu\text{mol/L}$  の MPAG をヒト MRP2, MRP3 あるいは MRP4 発現膜ベシクルと ATP あるいは AMP 存在下で所定時間  $37^\circ\text{C}$  で取り込みを行った。ミカエリス・メンテン式から求めたヒト MRP2, MRP3 及び MRP4 に対する MPAG の  $K_m$  及び  $V_{\max}$  を表 4 に示し、MPAG の各濃度に対する ATP 依存的な取り込み量を図 14 に示す。

ヒト MRP2 に対する MPAG の  $K_m$  ( $308\ \mu\text{mol/L}$ ) はヒト MRP3 に対する  $K_m$  ( $274\ \mu\text{mol/L}$ ) と等しかった。一方、ヒト MRP4 に対する MPAG の  $K_m$  ( $501\ \mu\text{mol/L}$ ) はヒト MRP2 及び MRP3 と比較して高かった。また、ヒト MRP3 に対する MPAG の  $V_{\max}$  ( $3550\ \text{pmol/min/mg protein}$ ) はヒト MRP4 に対する  $V_{\max}$  ( $612\ \text{pmol/min/mg protein}$ ) と比較して大きかった。これらの結果は、発現膜ベシクルの膜蛋白量あたりのヒト MRP3 及び MRP4 の発現量は不明なもの、ヒト MRP3 の方が MRP4 よりも MPAG の血液側膜を介した体循環への移行に関与することを示唆するものである。したがって、MPAG のヒト肝細胞内での胆管側膜を介した胆汁中への排泄には主に MRP2 が、血液側膜を介した体循環への移行には MRP3 及び MRP4 が関与し、その中でも主に MRP3 が関与していると考えられた。

图 13 Uptake of MPAG by membrane vesicles expressing human MRP2, MRP3, MRP4, or MRP8



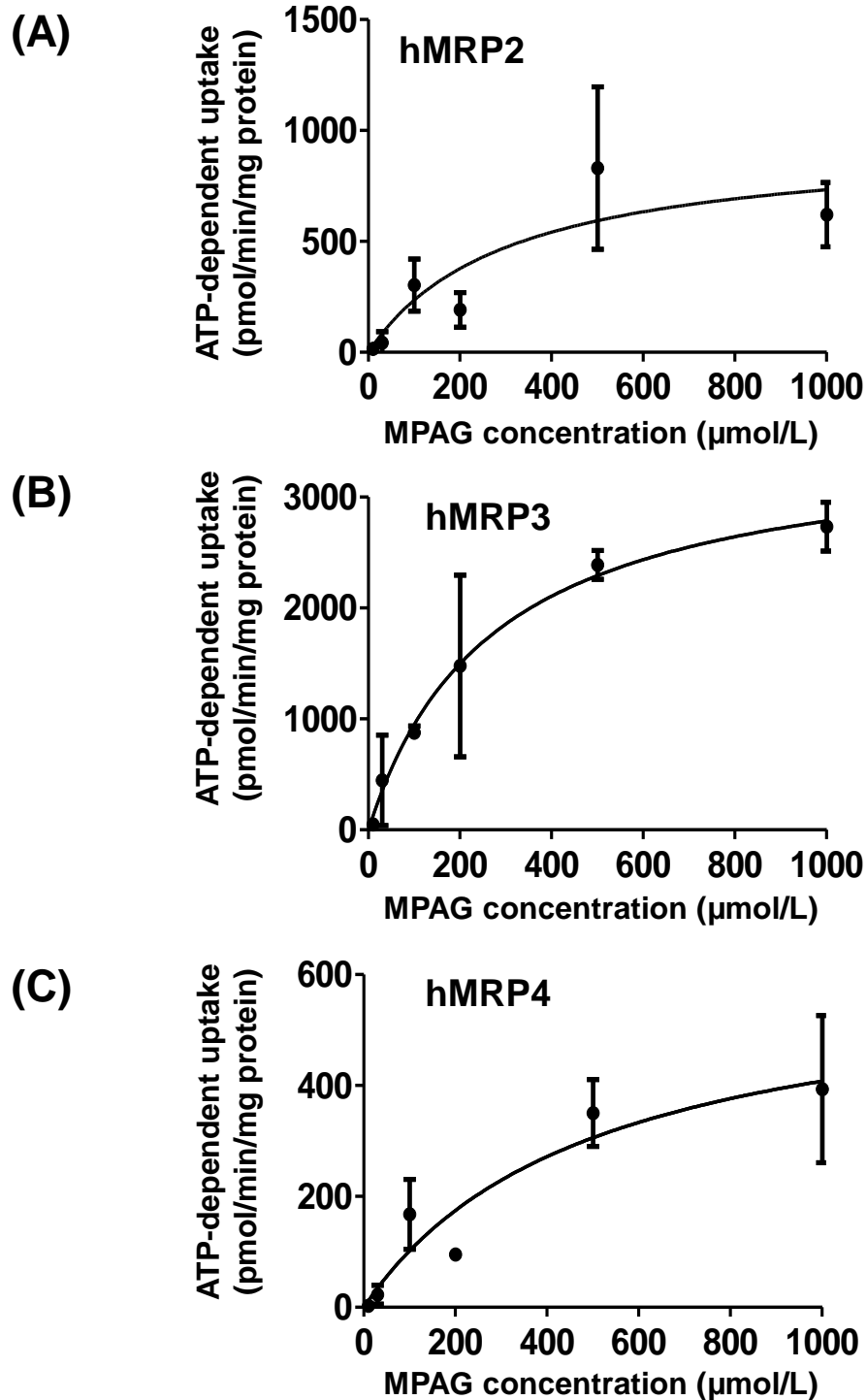
The uptake of 10  $\mu\text{mol/L}$  MPAG by membrane vesicles (0.5 mg/mL) was measured at 37°C for 5 min in the presence of ATP (solid bar) or AMP (open bar). Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three or four independent determinations.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  for ATP versus AMP (2-sample t test)

表 4 Kinetics parameters of MPAG for human MRP2, MRP3, and MRP4

human MRP	Km ( $\mu\text{mol/L}$ )	Vmax (pmol/min/mg protein)
MRP2	308	958.4
MRP3	274	3547
MRP4	501	612.1

☒ 14 ATP-dependent uptake of MPAG by membrane vesicles expressing human MRP2, MRP3, or MRP4



Membrane vesicles (0.5 mg/mL) were incubated at 37°C for 30 s (human MRP3) or 2 min (human MRP2 and MRP4) with 10–1000 μmol/L MPAG. ATP-dependent transport activity was calculated by subtracting transport activity in the presence of AMP from transport activity in the presence of ATP. Data represent the mean ± S.D. of three independent determinations.

#### 第四節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中の MPA 及び MPAG 肝動態モデリング

第三章 第二節の結果から、サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPA を添加したとき、バッファー中の MPA は速やかに肝細胞に取り込まれた後、UGT によって MPAG に代謝され、毛細胆管腔中への移行はほぼ無視できると考えられた。一方、第三章 第三節の結果から、肝細胞内で生成した MPAG はヒト MRP2 を介して毛細胆管腔中へ移行するとともに、主にヒト MRP3 を介してバッファー中へ移行すると考えられた。更に、第三章 第一節の結果から、バッファー中の MPAG は部分的に肝取り込みトランスポーターを介してヒト肝細胞に再び取り込まれていると考えられた。これら経時的に変化する事象に対する速度論的なアプローチ方法として、本研究では数理モデル解析による MPA 及び MPAG の *in vitro* 肝動態パラメータの推定を試みた。更に、得られたパラメータを変動させることで、バッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中 MPAG の量的変動をシミュレーションし、MPAG の肝動態を決定する律速過程を検討した。

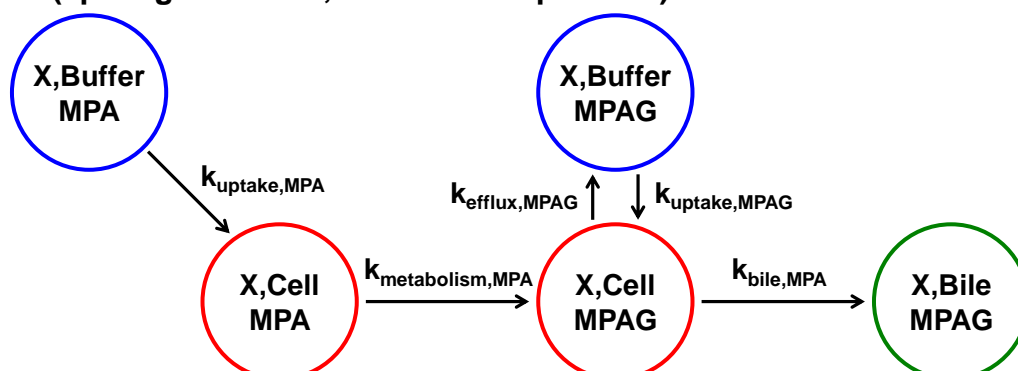
##### 第一項 解析方法

第三章 第二節で得られた MPA 及び MPAG のバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の経時的な量的推移に対する一次速度定数を、NONMEM version 7.1.2 (Globomax) を用いた非線形混合効果モデルで推定した。また、第三章 第一節で得られた MPAG のバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の経時的な量的推移に対する一次速度定数も同様に推定した。Subroutine は ADVAN 13 を使用した。

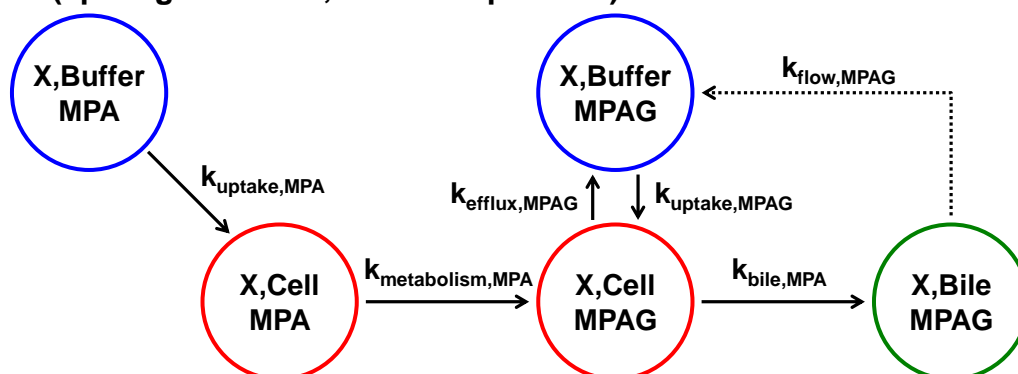
図 15 に検討したモデルを示す。Model 1 では毛細胆管腔からバッファーへの MPAG の漏出 (flow) は存在しないと仮定した。一方、Model 2 及び Model 3 では毛細胆管腔からバッファーへの漏出 (flow) が存在すると仮定した。

☒ 15 Schema of nonlinear mixed effect models for hepatic disposition of MPA and MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes

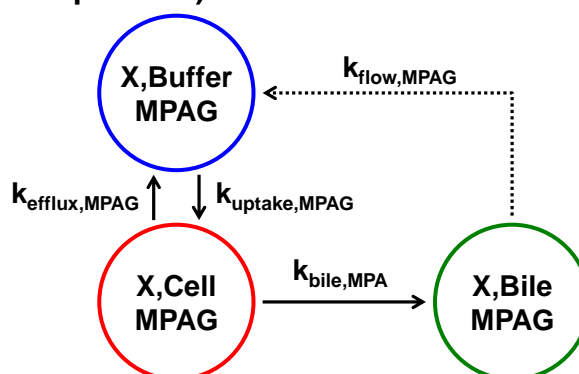
**Model 1 (spiking with MPA, without flow process)**



**Model 2 (spiking with MPA, with flow process)**



**Model 3 (spiking with MPAG, with flow process)**



Model 1 shows hepatic disposition of MPA and MPAG without including direct flow from the bile canaliculi to the buffer. Model 2 includes direct flow from the bile canaliculi to the buffer. Model 3 shows the hepatic disposition of MPAG including direct flow after spiking with MPAG.  $k_{\text{uptake,MPA}}$  and  $k_{\text{met,MPA}}$  are the first-order rate constants of MPA for uptake and intracellular metabolism to MPAG, respectively.  $k_{\text{uptake,MPAG}}$ ,  $k_{\text{efflux,MPAG}}$ ,  $k_{\text{bile,MPAG}}$  and  $k_{\text{flow,MPAG}}$  are the first-order rate constants of MPAG for uptake, basolateral efflux, biliary excretion, and flow from the bile canaliculi to the buffer, respectively.

MPA, MPAG のバッファー中, 肝細胞中及び毛細胆管腔中の経時的な量的推移から, Model 1 では以下の微分方程式によって各一次速度定数を推定した.

$$\begin{aligned}
\frac{dX_{MPA,m}}{dt} &= -k_{uptake,MPA} \times X_{MPA,m} \\
\frac{dX_{MPAG,m}}{dt} &= k_{efflux,MPAG} \times X_{MPAG,c} - k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} \\
\frac{dX_{MPA,c}}{dt} &= k_{uptake,MPA} \times X_{MPA,m} - k_{metabolism,MPA} \times X_{MPA,c} \\
\frac{dX_{MPAG,c}}{dt} &= k_{metabolism,MPA} \times X_{MPA,c} + k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} \\
&\quad - (k_{efflux,MPAG} + k_{bile,MPAG}) \times X_{MPAG,c} \\
\frac{dX_{MPAG,b}}{dt} &= k_{bile,MPAG} \times X_{MPAG,c}
\end{aligned}$$

ここで,  $k_{uptake}$ ,  $k_{efflux}$  及び  $k_{bile}$  はそれぞれ血液側から肝細胞内への取り込み (basolateral uptake), 肝細胞内から血液側への排出 (basolateral efflux) 及び肝細胞内から毛細胆管腔への移行 (biliary excretion) 過程の一次速度定数を示す.  $k_{metabolism}$  は細胞内代謝 (intracellular metabolism) 過程の一次速度定数を示す.  $X$  は MPA あるいは MPAG の各コンパートメントにおける量を示し, 付随する m, c 及び b はそれぞれ外部メディウム (バッファー), 肝細胞及び毛細胆管腔を意味する. なお, MPA 添加量は 300 pmol とした.

Model 2 では以下の微分方程式によって各一次速度定数を推定した.

$$\begin{aligned}
\frac{dX_{MPA,m}}{dt} &= -k_{uptake,MPA} \times X_{MPA,m} \\
\frac{dX_{MPAG,m}}{dt} &= k_{efflux,MPAG} \times X_{MPAG,c} - k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} + k_{flow,MPAG} \times X_{MPAG,b} \\
\frac{dX_{MPA,c}}{dt} &= k_{uptake,MPA} \times X_{MPA,m} - k_{metabolism,MPA} \times X_{MPA,c} \\
\frac{dX_{MPAG,c}}{dt} &= k_{metabolism,MPA} \times X_{MPA,c} + k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} \\
&\quad - (k_{efflux,MPAG} + k_{bile,MPAG}) \times X_{MPAG,c} \\
\frac{dX_{MPAG,b}}{dt} &= k_{bile,MPAG} \times X_{MPAG,c} - k_{flow,MPAG} \times X_{MPAG,b}
\end{aligned}$$

ここで,  $k_{flow}$  は毛細胆管腔からバッファーへの漏出 (flow) 過程の一次速度定数を示す. MPA 添加量は 300 pmol とした.

Model 3 では以下の微分方程式によって各一次速度定数を推定した.

$$\begin{aligned}
\frac{dX_{MPAG,m}}{dt} &= -k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} + k_{efflux,MPAG} \times X_{MPAG,c} + k_{flow,MPAG} \times X_{MPAG,b} \\
\frac{dX_{MPAG,c}}{dt} &= k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} - (k_{efflux,MPAG} + k_{bile,MPAG}) \times X_{MPAG,c} \\
\frac{dX_{MPAG,b}}{dt} &= k_{bile,MPAG} \times X_{MPAG,c} - k_{flow,MPAG} \times X_{MPAG,b}
\end{aligned}$$

MPAG 添加量は 300 pmol とした。

得られたパラメータ推定値を基に各時点の MPA 及び MPAG を予測し、実測値との比較を行った。また、Model 2 で得られたパラメータ推定値を用い、MPA 添加後 15 分における MPAG の basolateral uptake, basolateral efflux あるいは biliary excretion 過程をそれぞれ阻害した場合のシミュレーションを行った。シミュレーションには SAS version 9.2 及び NONMEM version 7.1.2 を用いた。

## 第二項 結果

MPA 及び MPAG のバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の経時的な量的推移から、**図 15** に示した Model 1（毛細胆管腔からバッファーへの漏出は存在しないと仮定）に基づいて一次速度定数を推定した。得られたパラメータ推定値から求めた各時点の推定値と実測値のスキッタープロットを**図 16**に示す。

Model 1 に基づいて予測されたバッファー中及び肝細胞中の MPA 及び MPAG は、実測値とほぼ一致するものであった（**図 16A～D**）。一方、毛細胆管腔中の MPAG は Model 1 では時間とともに過大評価する傾向が認められた（**図 16E**）。この結果は、Model 1 では毛細胆管腔からバッファーへの MPAG の漏出が存在しないと仮定されているため、時間を経るにしたがって予測値と実測値の間に乖離が生じたものと考えられた。そこで毛細胆管腔からバッファーへの漏出を組み込んだ Model 2 にて再度、モデル解析を行った。得られた各時点の予測値と実測値のスキッタープロットを**図 17**に示す。

Model 2 に基づいて予測されたバッファー中及び肝細胞中の MPA 及び MPAG は Model 1 と同様に実測値とほぼ一致した（**図 17A～D**）。更に、Model 1 では過大評価した毛細胆管腔中の MPAG についても、実測値とほぼ一致した（**図 17E**）。以上の検討から、サンドイッチ培養ヒト肝細胞における *in vitro* 肝動態モデリングでは、毛細胆管腔からバッファーへの漏出過程を組み込む必要性があると考えられた。Model 3 での数理モデル解析も同様に行った。Model 1～3 に基づいて得られたパラメータ推定値を**表 5**に示す。全てのパラメータ推定値の相対標準誤差（以下%RSE）は 30%未満であり、パラメータ推定は良好であった。

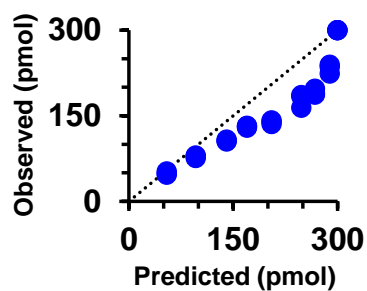
MPAG の肝動態の律速過程を評価するため、Model 2 で得られたパラメータ推定値を用い、MPAG の肝動態過程（basolateral uptake, basolateral efflux, biliary excretion）を 0～100%阻害したときのバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPAG をシミュレーションした。その結果を**図 18**に示す。なお、Model 2 では毛細胆管腔からバッファーへの漏出が存在するため、basolateral efflux 過程のみを介したバッファー中 MPAG 量の変動も検討した。



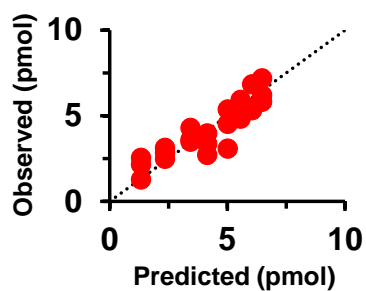
Basolateral uptake 過程を阻害 (0~100%) しても、バッファー中、肝細胞中あるいは毛細胆管腔中の MPAG はいずれもほとんど変化しなかった (図 18A~C) . 一方, basolateral efflux あるいは biliary excretion 過程を阻害したときは, 各コンパートメント中の MPAG は阻害率に応じて変動した (図 18D~F) . 特に, basolateral efflux 過程を阻害した場合は, 肝細胞中の MPAG の上昇に伴い biliary excretion 過程を介した毛細胆管腔中の MPAG が増加し (図 18F) , 対照的にバッファー中の MPAG は著しく低下した (図 18D) . また, biliary excretion 過程を阻害したとき, 肝細胞中の MPAG が増加することで間接的に, basolateral efflux 過程を介したバッファー中の MPAG が増加した (図 18G 及び H) . 各コンパートメント中の MPAG の変動幅を考慮すると, biliary excretion 過程よりも basolateral efflux 過程の阻害によって, バッファー中, 肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPAG がより大きく変動した. このことから, ヒト肝細胞中で生成した MPAG の肝動態の律速過程は basolateral efflux 過程であると考えられた.

☒ 16 Diagnostic plots based on Model 1

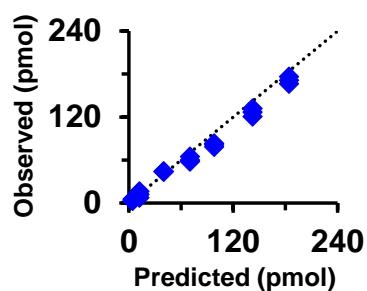
(A) MPA in buffer



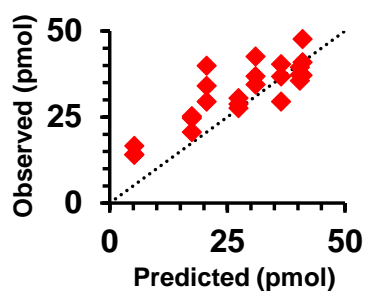
(B) MPA in cells



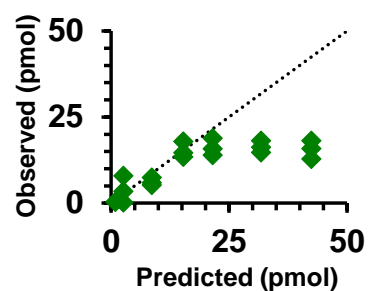
(C) MPAG in buffer



(D) MPAG in cells



(E) MPAG in bile



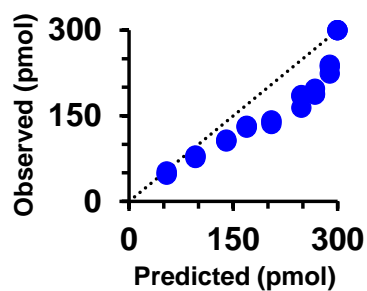
The dashed line represents a correlation coefficient of 1.

●, MPA in buffer; ●, MPA in hepatocytes;

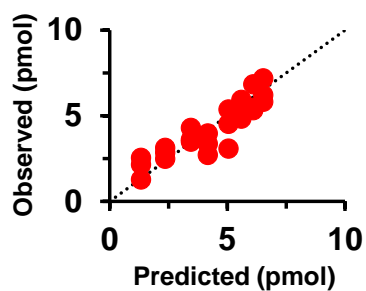
◆, MPAG in buffer; ◆, MPAG in hepatocyte; ◆, MPAG in bile canaliculi

☒ 17 Diagnostic plots based on Model 2

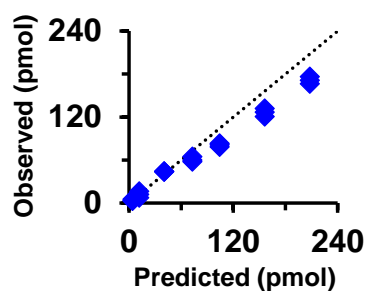
(A) MPA in buffer



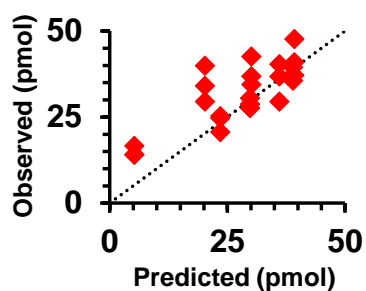
(B) MPA in cells



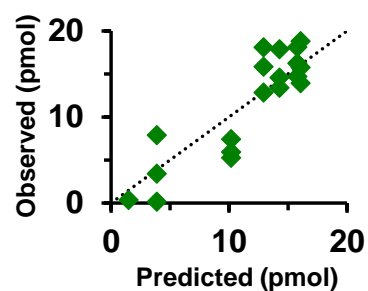
(C) MPAG in buffer



(D) MPAG in cells



(E) MPAG in bile



The dashed line represents a correlation coefficient of 1.

●, MPA in buffer; ●, MPA in hepatocytes;

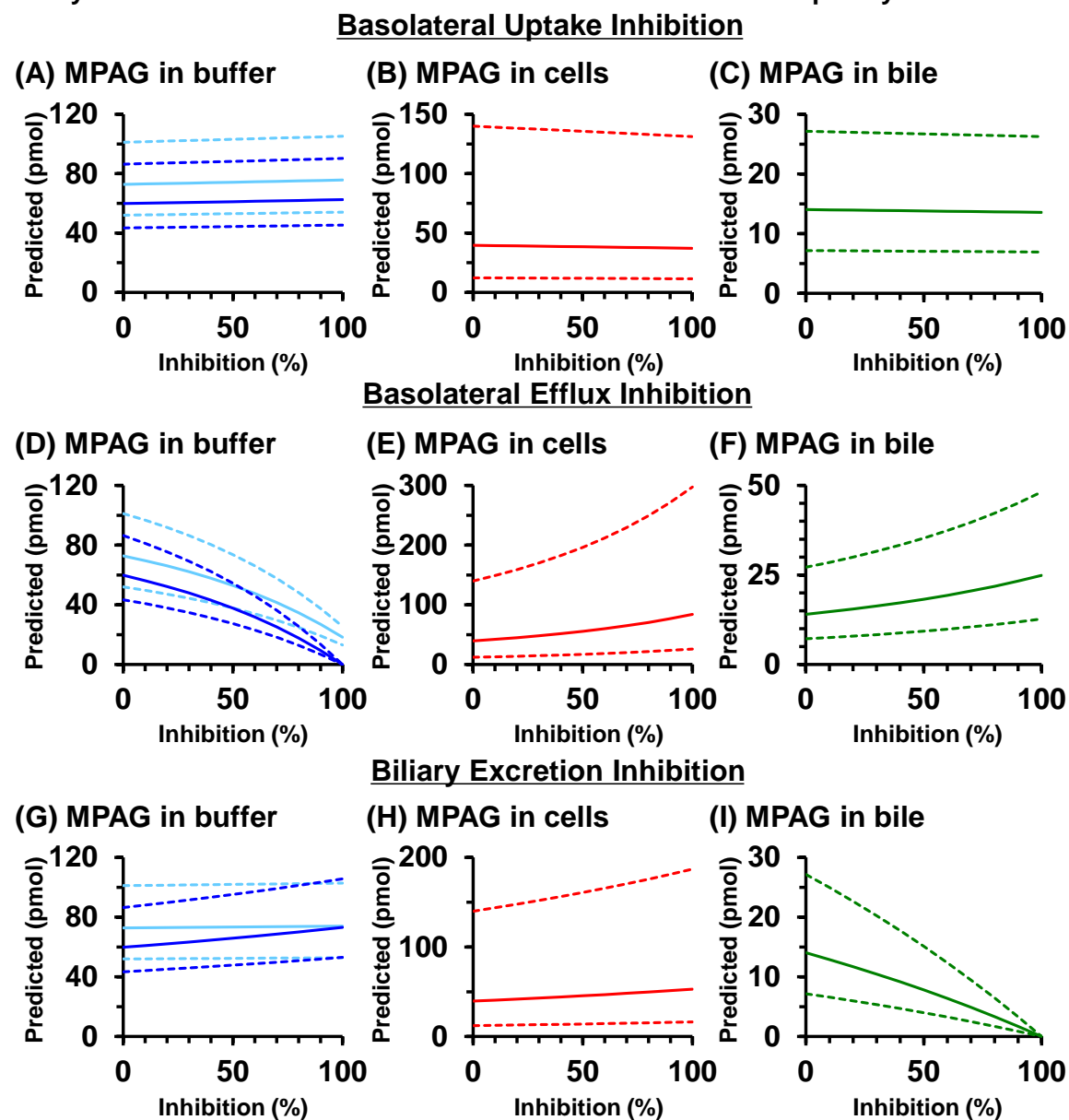
◆, MPAG in buffer; ◆, MPAG in hepatocyte; ◆, MPAG in bile canaliculi

**表 5 Parameter estimates from the final population pharmacokinetic model**

Model	Parameter	Estimate (min <sup>-1</sup> )	%RSE
1	k <sub>uptake,MPA</sub>	0.0379	2.8
	k <sub>metabolism,MPA</sub>	1.59	3.0
	k <sub>uptake,MPAG</sub>	0.00318	29.0
	k <sub>efflux,MPAG</sub>	0.151	0.3
	k <sub>bile,MPAG</sub>	0.0323	26.6
2	k <sub>uptake,MPA</sub>	0.0381	0.6
	k <sub>metabolism,MPA</sub>	1.58	1.4
	k <sub>uptake,MPAG</sub>	0.0111	29.5
	k <sub>efflux,MPAG</sub>	0.143	2.6
	k <sub>bile,MPAG</sub>	0.0591	7.4
	k <sub>flow,MPAG</sub>	0.122	5.6
3	k <sub>uptake,MPAG</sub>	0.0815	0.6
	k <sub>efflux,MPAG</sub>	6.02	2.4
	k <sub>bile,MPAG</sub>	0.228	0.1
	k <sub>flow,MPAG</sub>	0.0403	0.9

The parameters were estimated using NONMEM (subroutine ADVAN 13) using mass balance–time profiles of the hepatic disposition of MPA and MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes.

**Figure 18** Simulations of inhibitory effects on basolateral uptake, basolateral efflux, and biliary excretion of MPAG formed in sandwich-cultured human hepatocytes



The predicted changes in the amount of MPAG in the buffer (A, D, and G), hepatocytes (B, E, and H), and bile canaliculi (C, F, and I) are indicated. The simulations were performed using the final population pharmacokinetic model (Model 2 in Figure 15). The 5th and 95th percentiles (upper and lower dashed line) and the median (middle solid line) obtained from 1000 simulated independent experiments are shown. The blue line indicates the efflux-mediated MPAG profile. The light blue line indicates the whole MPAG profile in the buffer. The red and green lines indicate the MPAG profiles in the hepatocytes and bile canaliculi, respectively.

## 第五節 小括

サンドイッチ培養肝細胞中で生成した代謝物の肝動態を評価するためには、肝細胞中と毛細胆管腔中の代謝物を測定するだけでなく、バッファー中の代謝物も測定する必要があると考えられた。このため、本章では代謝物が胆汁中へ排泄されるとともに、体循環へも多く移行するモデル薬物として MPA を用い、サンドイッチ培養肝細胞中での経時的なバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPA 及び MPAG の量的推移を検討した。更に、得られた MPA 及び MPAG の量的時間推移から、速度論に基づいた肝動態モデリングを行った。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に代謝物である MPAG を添加し、肝取り込み過程の検討を行った結果、 $K_m$  及び  $V_{max}$  から算出された  $CL_{uptake,int}$  ( $8.38 \mu L/2min/mg \text{ protein}$ ) は  $P_{dif}$  ( $23.4 \mu L/2min/mg \text{ protein}$ ) の約 1/3 であり、MPAG の肝取り込み過程におけるヒト肝取り込みトランスポーターの関与は、約 1/4 程度であることが示唆された。ヒト肝細胞の試験系間（浮遊細胞系とサンドイッチ培養）でのヒト肝取り込みトランスポーターの活性あるいは発現変動の比較は、これまでに複数報告されている。例えば、タウロコール酸やジゴキシン、エストロン 3-硫酸を基質とした検討では、ヒト肝細胞への各化合物の取り込み量は浮遊細胞系とサンドイッチ培養系ではほぼ同程度であったとの報告<sup>79)</sup>や、サンドイッチ培養ヒト肝細胞におけるヒト OATP1B1 及び OATP1B3 の発現レベルは、培養期間中に変動しなかったとの報告<sup>80)</sup>がある。このため、本研究で得られた MPAG の肝取り込み過程に対するヒト肝取り込みトランスポーターの寄与率は、一般に肝取り込みトランスポーター評価に用いられる試験系（浮遊細胞系）と大きく異ならないと考えられた。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPAG あるいは MPA を添加したとき、BEI 及び毛細胆管腔中の MPAG は経時的に増加し、MPAG は胆管側膜トランスポーターの良好な基質と考えられた。一方、MPA 添加後のバッファー中の MPAG の増加は毛細胆管腔中の MPAG の増加を上回るのものであった。このことから、肝細胞内で生成した MPAG は胆管側膜を介して毛細胆管腔へ移行するとともに、血液側膜を介してバッファー中へ排出されていると考えられた。このため、ヒト肝細胞に発現している MRP 発現膜ベシクルを用いて基質認識性を評価した結果、MPAG はヒト MRP2 のみならず、MRP3 及び MRP4 の基質であることが明らかとなった。更に、 $K_m$  及び  $V_{max}$  の比較から、MPAG のヒト肝細胞内での胆管側膜を介した胆汁中排泄には主に MRP2 が、血液側膜を介した体循環への移行には MRP3 及び MRP4 が関与し、中でも MRP3 が主に関与していることが示唆された。本研究で得られたヒト MRP2 に対する MPAG の  $K_m$  は  $308 \mu mol/L$  であり、既報 ( $224.2 \mu mol/L$ )<sup>77)</sup>と同程度であった。一方、MPAG がヒト MRP3 及び MRP4 の基質となることは、本研究によって初めて明らかとなった。ヒトでは MPAG は胆汁中に排泄される一方、その血中曝露は MPA よりも多く、また、投与された MPA の 90%以上が最終的に MPAG として尿中に排泄されている

ことを考慮すると、肝細胞内で生成した MPAG の体循環に移行する過程に影響する因子、特にヒト MRP3 が MPAG の体内動態に及ぼす影響は大きいと考えられる。ヒト MRP3 には、mRNA 発現量や蛋白発現量に大きな個体差が存在することが報告されている (mRNA は 86 倍、蛋白としては 84 倍の個体差)<sup>81)</sup>。MPA とともに、MPAG の血中曝露の個体差が大きいことが報告されているが<sup>82)</sup>、ヒト MRP3 をコードする遺伝子 *ABCC3* には輸送活性や蛋白発現量が変動する遺伝子多型が複数報告されている<sup>83)</sup>。更に、ヒト MRP3 の基質であるモルヒネのグルクロン酸抱合体の体内動態が、*ABCC3* 遺伝子多型 (-211C>T) によって有意に影響を受けることが最近報告された<sup>84)</sup>。このため、今後ヒト MRP3 と MPAG の体内動態に関する更なる研究が期待される。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞中の MPA 及び MPAG の肝動態モデリング (Model 2) から推定された  $k_{\text{metabolism,MPA}}$  は  $1.58 \text{ min}^{-1}$  と、肝細胞内に取り込まれた MPA は非常に速やかに MPAG に代謝されることが明らかとなった。また、 $k_{\text{efflux,MPAG}}$  ( $0.143 \text{ min}^{-1}$ ) は  $k_{\text{bile,MPAG}}$  ( $0.0591 \text{ min}^{-1}$ ) よりも約 2.4 倍大きかった。ヒト MRP2 及びヒト MRP3 に対する MPAG の  $K_m$  に差は認められなかったことから、肝細胞内で生成した MPAG は毛細胆管腔中よりもバッファー中へ移行していることが明白である。また、膜ベシクル試験で求めた  $V_{\text{max}}$  を比較すると (ヒト MRP2 :  $958 \text{ pmol/min/mg protein}$ , ヒト MRP3 :  $3550 \text{ pmol/min/mg protein}$ )、ヒト MRP3 に対する MPAG の  $V_{\text{max}}$  はヒト MRP2 よりも約 3.7 倍高く、数理モデル解析で得られたパラメータ推定値と近かった。以上のことから、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での MPA 及び MPAG の肝動態は *in vivo* を反映することが示唆され、また、*in vitro* 肝動態を数学的なモデルによる解析で得られるパラメータ推定値は、*in vivo* を予測するための有益な情報になると考えられた。

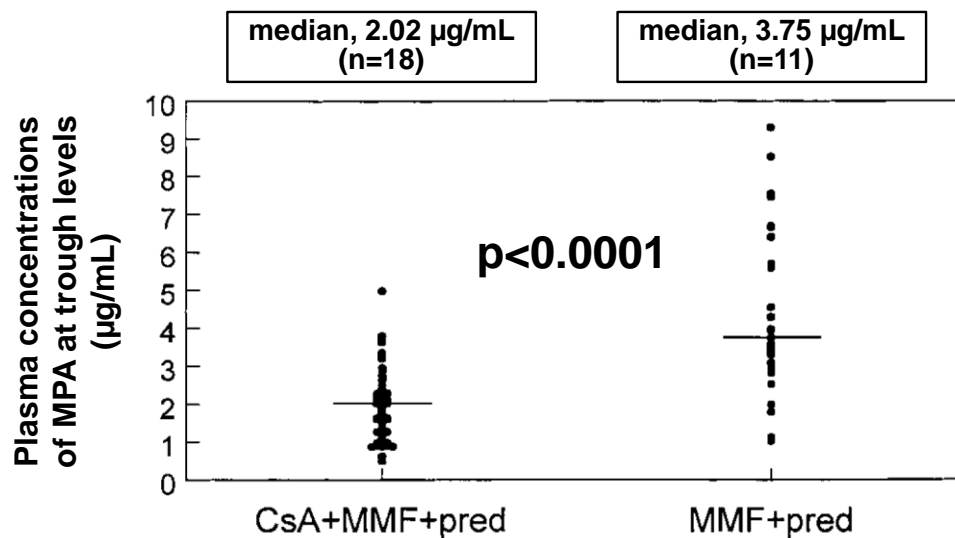
数理モデル解析で推定したパラメータを用い、MPAG の肝動態の律速過程を検討した結果、肝細胞内で生成した MPAG の律速過程は basolateral efflux 過程と考えられた。一方、MPA を添加後の肝動態モデルでは、basolateral uptake 過程を 100%阻害しても、各コンパートメント中 MPAG はほとんど変動しなかった。これは肝細胞内からバッファーへの MPAG の移行速度が、バッファーから肝細胞内への MPAG の取り込み速度よりも大きいことに起因すると考えられた。このことから、MPAG の肝取り込み過程の阻害評価は MPA を添加後の数理モデルから推定するのではなく、MPAG を添加後の数理モデルを用いて、阻害パラメータを推定する必要があると考えられた。

#### 第四章 モデリング解析による MPA と CsA 間の相互作用評価

MPA はカルシニューリン阻害薬とは異なる作用点を有する免疫抑制薬であることから、臨床ではカルシニューリン阻害薬としばしば併用される。図 19 に示すように、腎移植患者にカルシニューリン阻害薬である CsA と MPA を併用したときの血漿中 MPA のトラフ濃度は、CsA 非併用群と比較して有意に低下することが報告されている<sup>85)</sup>。血漿中 MPA 濃度の低下は移植後の拒絶反応につながる恐れがあり、この MPA と CsA 間の薬物間相互作用は临床上、問題視される。

MPA は UGT によって MPAG に代謝されるが、このグルクロン酸抱合代謝には少なくとも 5 種の UGT が関与し、中でも UGT1A9 がその主役を担う<sup>86)</sup>。また、MPA はヒト肝取り込みトランスポーター OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではないが、MPAG はヒト OATP1B1 及び OATP1B3 の基質である<sup>87), 88)</sup>。更に、第三章で明らかとなったように、肝臓内 MPAG の胆汁中排泄にはヒト MRP2 が<sup>76), 77)</sup>、体循環への移行にはヒト MRP3 が関与する。CsA は CYPs<sup>89)</sup> や UGTs<sup>90)</sup> の薬物代謝酵素だけでなく、OATPs<sup>91)</sup> や MRPs<sup>92)</sup> といった薬物トランスポーターに対しても広く阻害作用を有する。以上のことから、CsA は MPA あるいは MPAG の肝動態に関与する複数の因子を阻害することで、臨床において MPA のトラフ血漿中濃度を低下させると考えられている。

図 19 MPA trough levels in kidney allograft patients following MPA and predonisone (pred) with or without CsA



(引用文献 85) を改変)



## 第一節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 相互作用試験

前述の通り、MPA あるいは MPAG の肝動態に関与する因子に対して、CsA は複数の過程を阻害している可能性が考えられる。肝ミクロソームやトランスポーター発現細胞、あるいは膜ベシクルを用いることで、MPA あるいは MPAG の肝動態における各過程に対する CsA の影響について評価が可能である。一方、得られた結果を肝動態全体にスケールアップする際、異なる試験系であることや、肝細胞内での阻害（代謝酵素や ABC トランスポーター阻害）における細胞内濃度の考え方、また、それら因子が全体の輸送あるいは代謝に寄与する割合を考慮する必要等、課題が多い。このため、肝動態に関与する輸送と代謝を同時に評価できるサンドイッチ培養肝細胞は、輸送と代謝が複雑に関係する薬物間相互作用を評価する上でも、有益な試験系と考えられる。そこで、サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPA あるいは MPAG を CsA と同時に添加し、MPA 及び MPAG の肝動態に与える CsA の影響を検討した。

## 第一項 実験方法

第三章 第一節 第一項に記載したヒト凍結肝細胞（ロット IZT）を使用した。CsA は Sigma-Aldrich（St. Louis, Missouri, 米国）から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを使用した。

0, 0.01, 0.1, 1, 10 あるいは  $50\ \mu\text{mol/L}$  の CsA を含む  $1\ \mu\text{mol/L}$  MPA 又は MPAG 含有 Ca/Mg(+)若しくは Ca/Mg(-)バッファーを用いて実験を行った。反応時間は MPA を基質とした場合は 15 分、MPAG を基質とした場合は 5 分とした。その他の実験方法や前処理方法、分析条件は第三章 第一節 第一項あるいは第三章 第二節 第一項に準じた。

細胞溶解液中 MPA 濃度及び MPAG 濃度と蛋白定量値から、蓄積量（accumulation, pmol/mg protein）を算出した。また、バッファー及び細胞溶解液の総量から、バッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPA 及び MPAG 量を求めた。第二章 第二節 第一項に準じて BEI を算出した。

## 第二項 統計解析

第二章 第三節 第二項に準じて、Ca/Mg(-)条件下に対する Ca/Mg(+)条件下の MPA あるいは MPAG の蓄積量について、2-sample t 検定を行った。

## 第三項 結果

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に  $1\ \mu\text{mol/L}$  の MPAG を  $0\sim 50\ \mu\text{mol/L}$  の CsA と同時に添加したときの MPAG の蓄積量及び BEI を図 20 に示す。

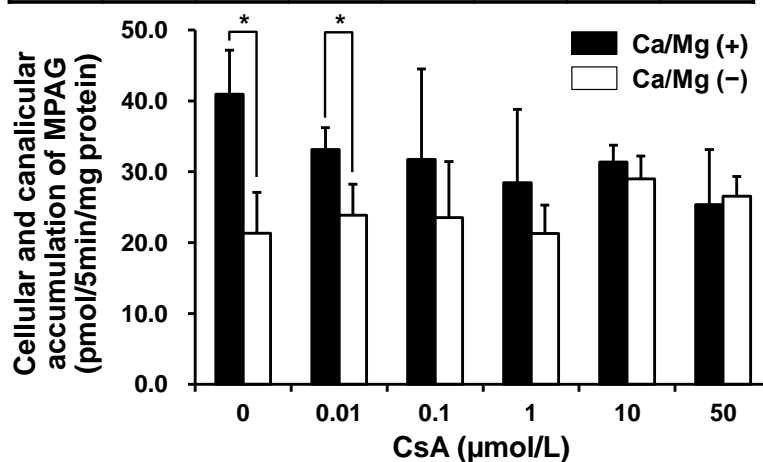
MPAG の蓄積量から求めた BEI は、CsA の濃度上昇に応じて低下した。CsA 非添加あるいは  $0.01 \mu\text{mol/L}$  の CsA 存在下での MPAG の蓄積量は Ca/Mg(+)条件下の方が Ca/Mg(-)条件下よりも有意に高かったが、 $0.1 \mu\text{mol/L}$  以上の CsA 存在下でその有意差は消失した。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に  $1 \mu\text{mol/L}$  の MPA を  $0 \sim 50 \mu\text{mol/L}$  の CsA と同時に添加したときのバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPA 及び MPAG の量的変動及び BEI を図 21 に示す。また、MPA 及び MPAG の *in vitro* 試験系における物質収支を図 22 に示す。

Ca/Mg(+)条件下における MPA の蓄積量は、 $1 \mu\text{mol/L}$  の CsA 存在下で CsA 非添加に比べて有意に低かった。一方、Ca/Mg(-)条件下では差がなく、また CsA の濃度に応じた変化も認められなかった (図 21A)。また、バッファー中 MPA 濃度も、CsA の濃度依存的な影響は認められなかった (図 21B)。これらの結果から、CsA は MPA の輸送過程には影響しないと考えられた。一方、MPA 添加後の MPAG の BEI は、MPAG 添加時と同様に CsA 濃度依存的に低下した。更に、バッファーの条件を問わず、MPA 添加時において  $10 \mu\text{mol/L}$  以上の CsA の存在下で MPAG の蓄積量は有意に上昇し (図 21C)、それと対応するようにバッファー中 MPAG 濃度は  $10 \mu\text{mol/L}$  以上の CsA の存在によって低下した (図 21D)。これらの結果は、ヒト肝細胞内で生成した MPAG の MRPs を介した毛細胆管腔中及びバッファー中への移行が CsA によって阻害されたために、ヒト肝細胞中の MPAG が増加したことを示唆するものであった。また、MPA 及び MPAG のサンドイッチ培養ヒト肝細胞試験系におけるそれぞれの物質収支は CsA の存在によって影響を受けず、それらの和は添加量 ( $300 \text{ pmol}$ ) と同程度であった。このことは、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での MPA の代謝は主に MPAG へのグルクロン酸抱合代謝で説明できること、並びに CsA がサンドイッチ培養ヒト肝細胞中での MPA から MPAG へのグルクロン酸抱合代謝に影響しないことを示唆するものであった。

☒ 20 Effect of CsA on MPAG accumulation in sandwich-cultured human hepatocytes

BEI (%)	Mean	48.6	28.3	24.0	22.0	7.7	1.2
SD		6.8	6.8	17.6	19.1	6.9	2.1

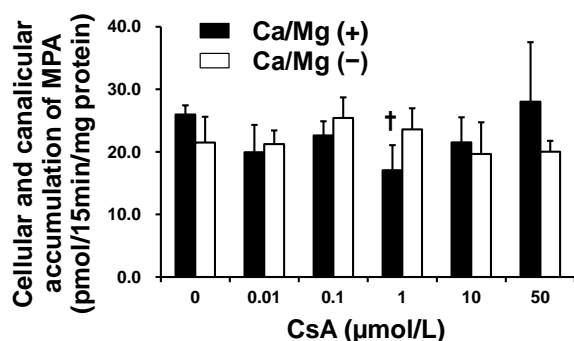


MPAG (1 μmol/L) was incubated with sandwich-cultured human hepatocytes at 37°C for 5 min in Ca<sup>2+</sup>(+) (solid bar) or Ca<sup>2+</sup>(-) buffer (open bar) in the presence of CsA (0–50 μmol/L). Data represent the mean + S.D. of three independent experiments with one lot of human hepatocytes. BEI was assumed to be zero if the difference between Ca/Mg(+) and Ca/Mg(-) conditions was negative.

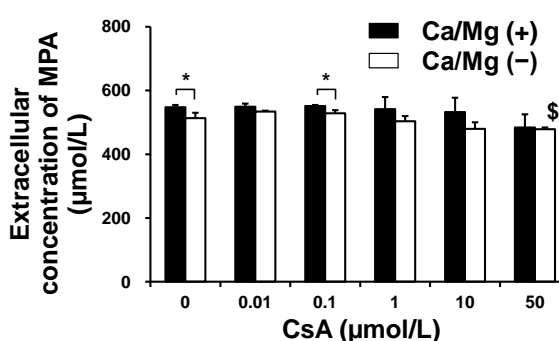
\* p < 0.05 for Ca<sup>2+</sup>(+) versus Ca<sup>2+</sup>(-) conditions (paired t test)

☒ 21 Effect of CsA on hepatic disposition of MPA and MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes

(A) MPA accumulation

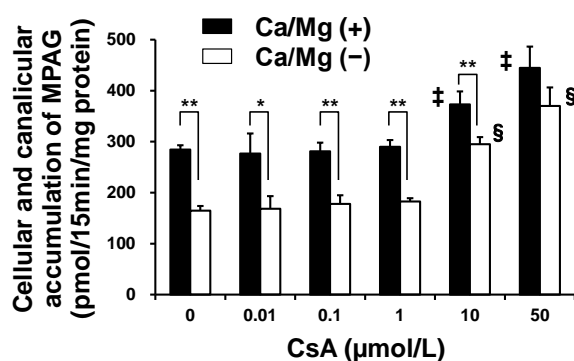


(B) MPA in buffer

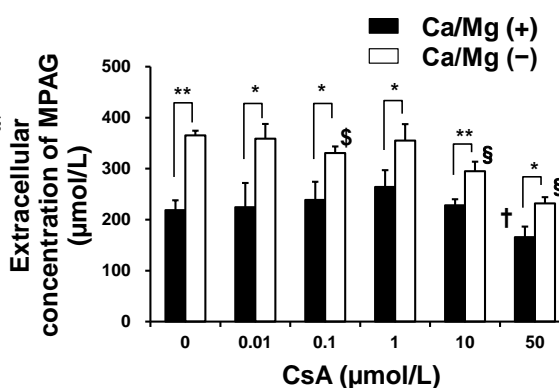


(C) MPAG accumulation

BEI	Mean	42.1	39.1	36.8	36.8	20.7	16.8
(%)	SD	3.1	2.2	3.0	4.6	3.9	3.9



(D) MPAG in buffer



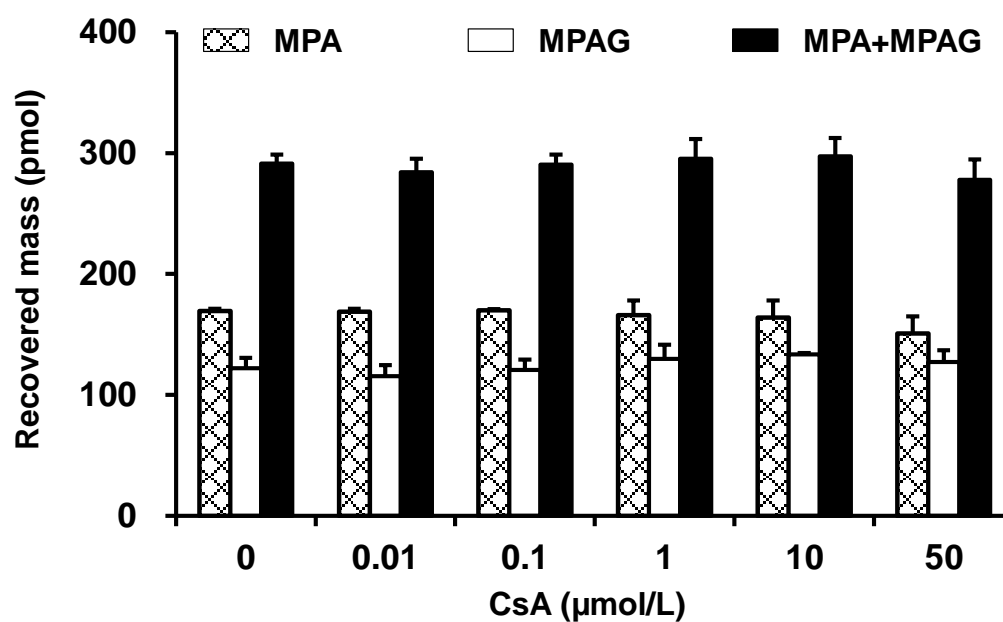
MPA (1  $\mu\text{mol/L}$ ) was incubated with sandwich-cultured human hepatocytes at 37°C for 15 min in  $\text{Ca}^{2+}(+)$  (solid bar) or  $\text{Ca}^{2+}(-)$  buffer (open bar) in the presence of CsA (0–50  $\mu\text{mol/L}$ ). Data represent the mean + S.D. of three independent experiments with one lot of human hepatocytes.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  for  $\text{Ca}^{2+}(+)$  versus  $\text{Ca}^{2+}(-)$  conditions (paired t test)

†  $p < 0.05$ , ‡  $p < 0.01$  for presence versus absence of CsA in  $\text{Ca}^{2+}(+)$  conditions (paired t test)

§  $p < 0.05$ , §  $p < 0.01$  for presence versus absence of CsA in  $\text{Ca}^{2+}(-)$  conditions (paired t test)

☒ 22 Influence of CsA on mass balance of MPA and MPAG in cellular, canalicular and extracellular compartments



Data represent the mean + S.D. of three independent experiments with one lot of human hepatocytes.

## 第二節 ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝阻害試験

第四章 第一節の結果から、サンドイッチ培養ヒト肝細胞における MPA から MPAG へのグルクロン酸抱合代謝に、CsA は阻害作用を有さないことが示唆された。一方で、ラット肝ミクロソームを用いた試験において、MPA から MPAG への抱合代謝を CsA は濃度依存的に阻害することが報告されている<sup>40)</sup>。このため、ヒト肝ミクロソーム中での MPA から MPAG へのグルクロン酸抱合代謝に対する CsA の影響を検討した。

### 第一項 実験方法

ヒト肝ミクロソーム（50 ドナーのプール，mixed gender）は XENOTECH LLC から購入した。Quercetin は Sigma-Aldrich から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを使用した。

UGT の補酵素として UDPGA を添加したヒト肝ミクロソーム（0.25 mg/mL）の反応液に、MPA（1  $\mu$ mol/L）を CsA（0, 0.01, 0.1, 1, 10 あるいは 50  $\mu$ mol/L）と同時に添加し、37°C で代謝反応を行った。反応時間は代謝反応の直線性が認められた時間、すなわち 10 分間とした。MPA を反応させた後、反応液に対して 5 倍量のエタノールを添加して反応を停止させた。以降の前処理方法及び分析条件は第三章 第一節 第一項に準じた。なお、UGT 代謝阻害の陽性対照として、quercetin（100  $\mu$ mol/L）を用いた。

#### バッファの組成

内容	組成
バッファ	50 mM Tris-HCl バッファ（pH 7.5），8 mM 塩化マグネシウム，5 mM UDPGA，25 $\mu$ g/mL アラメチシン

CsA 非添加における反応液中の MPAG 濃度を 100%として、CsA あるいは quercetin 存在下における生成した MPAG の相対割合を算出した。

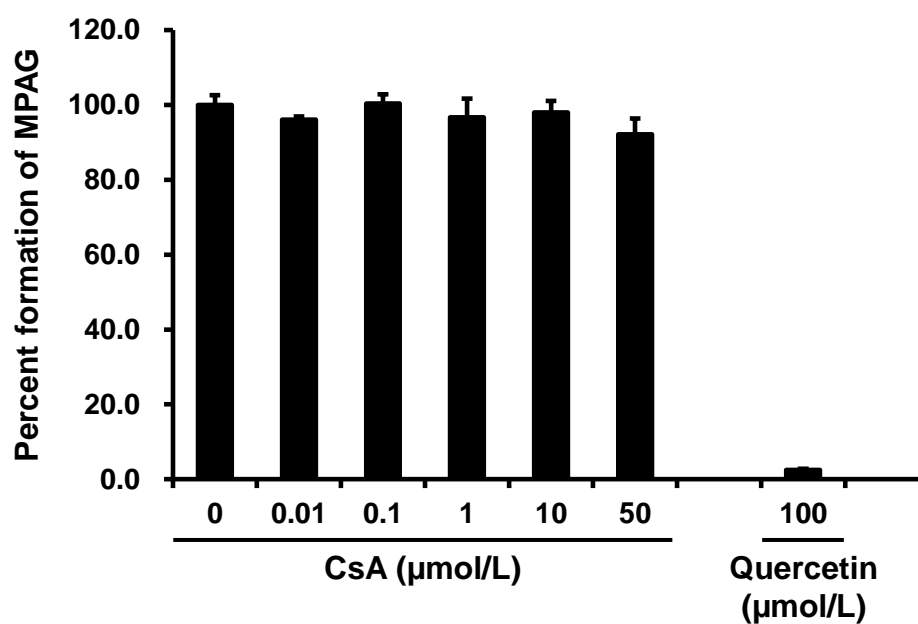
### 第二項 結果

ヒト肝ミクロソーム中での MPA から MPAG へのグルクロン酸抱合代謝に与える CsA 及び quercetin の影響を図 23 に示す。

CsA は 50  $\mu$ mol/L の濃度まで、ヒト肝ミクロソーム中での MPA から MPAG へのグルクロン酸抱合代謝を阻害しなかった。一方、陽性対照として用いた quercetin はヒト肝ミクロソーム中での MPAG の生成をほぼ完全に阻害した。これらの結果は、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での MPAG の生成に CsA は影響しないと考えられた前節の結果と一致するものであった。CsA は複数の UGT 分子種に対して阻害作用を示すことが報告されており、各 UGT 分子種を過剰発現させたミクロソームを用いた検討では、CsA は UGT1A1 及び UGT1A4 に

対してそれぞれ  $48 \mu\text{mol/L}$  及び  $23 \mu\text{mol/L}$  の  $\text{IC}_{50}$  を示すが、UGT1A6, UGT2B7 及び UGT2B1 を阻害しない<sup>90)</sup>。MPA のグルクロン酸抱合代謝に関与する UGT 分子種は UGT1A1, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 及び UGT1A10 であり、中でも UGT1A9 が肝臓ではその約 50%に関与する<sup>86)</sup>。また、UGT1A9 に対する MPA の  $K_m$  ( $0.16 \mu\text{mol/L}$ ) は UGT1A1 の  $K_m$  ( $0.41 \mu\text{mol/L}$ ) よりも低く、また、UGT1A9 発現ミクロソーム中で生成した MPAG の  $V_{\max}$  ( $11.82 \text{ nmol/min/mg protein}$ ) も、UGT1A1 発現ミクロソームにおける  $V_{\max}$  ( $0.11 \text{ nmol/min/mg protein}$ ) よりも 100 倍以上大きい<sup>93)</sup>。これらの報告は、ヒト肝ミクロソーム中での MPA から MPAG のグルクロン酸抱合代謝において、CsA が阻害作用を有する UGT1A1 の寄与は小さいことを示すものであり、今回得られた結果を説明できる。

☒ 23 Inhibitory effects of CsA and quercetin on formation of MPAG in human liver microsomes



MPA (1 μmol/L) was incubated with human liver microsomes (0.25 mg/mL) at 37°C for 10 min in the presence of CsA (up to 50 μmol/L) or quercetin at 100 μmol/L. Data represent the mean + S.D. of three independent experiments with one lot of human liver microsomes.



### 第三節 モデリング解析による CsA の阻害パラメータ算出

数学的モデルに基づく解析の応用性として、一旦モデルが構築されると、パラメータ変動に伴う様々な変化をモデルに基づいてシミュレーションが可能になる<sup>49)</sup>。第四章 第一節の結果から、CsA は MPA の輸送及び代謝過程には影響しない一方、MPAG の複数の輸送過程に対して阻害することが示唆された。このため、既に第三章 第四節において構築したサンドイッチ培養ヒト肝細胞における MPA 及び MPAG の肝動態モデルを用い、MPAG の各輸送過程に対する CsA の阻害パラメータを、数理モデルに基づいて推定した。

#### 第一項 解析方法

第三章 第四節で得られたサンドイッチ培養ヒト肝細胞における MPA 及び MPAG の肝動態パラメータ推定値 (Model 2) , 及び第四章 第一節で得られた CsA (0~50  $\mu$  mol/L) 存在下でのバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPA 及び MPAG のデータを用いた。解析には NONMEM version 7.1.2 を用い、subroutine は ADVAN 13 を使用した。

以下の微分方程式及び陽関数によって、MPAG 添加後のサンドイッチ培養ヒト肝細胞における MPAG 肝動態に対する CsA の阻害パラメータを推定した。

$$\begin{aligned}\frac{dX_{MPAG,m}}{dt} &= -k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} \times (1 - I_{uptake}) + k_{efflux,MPAG} \times X_{MPAG,c} \\ &\quad \times (1 - I_{efflux}) + k_{flow,MPAG} \times X_{MPAG,b} \\ \frac{dX_{MPAG,c}}{dt} &= k_{uptake,MPAG} \times X_{MPAG,m} \times (1 - I_{uptake}) \\ &\quad - \{k_{efflux,MPAG} \times (1 - I_{efflux}) + k_{bile,MPAG} \times (1 - I_{bile})\} \times X_{MPAG,c} \\ \frac{dX_{MPAG,b}}{dt} &= k_{bile,MPAG} \times X_{MPAG,c} \times (1 - I_{bile}) - k_{flow,MPAG} \times X_{MPAG,b} \\ I_{uptake} &= \frac{I_{max,uptake} \times [I]^{\gamma_{uptake}}}{IC_{50,uptake}^{\gamma_{uptake}} + [I]^{\gamma_{uptake}}} \\ I_{efflux} &= \frac{I_{max,efflux} \times [I]^{\gamma_{efflux}}}{IC_{50,efflux}^{\gamma_{efflux}} + [I]^{\gamma_{efflux}}} \\ I_{bile} &= \frac{I_{max,bile} \times [I]^{\gamma_{bile}}}{IC_{50,bile}^{\gamma_{bile}} + [I]^{\gamma_{bile}}}\end{aligned}$$

ここで、 $k_{uptake}$ 、 $k_{efflux}$  及び  $k_{bile}$  はそれぞれ血液側から肝細胞内への取り込み (basolateral uptake) , 肝細胞内から血液側への排出 (basolateral efflux) 及び肝細胞内から胆汁中への排泄 (biliary excretion) 過程の一次速度定数を示す。 $k_{flow}$  は毛細胆管腔からバッファーへの漏出 (flow) の一次速度定数を示す。 $X$  は MPA あるいは MPAG の各コンパートメントにおける量を示し、付随する m, c 及び b はそれぞれ外部メディウム (バッファー) , 肝細胞及び毛細胆管腔を意味する。 $I_{uptake}$ 、 $I_{efflux}$  及び  $I_{bile}$  はそれぞれ MPAG の basolateral uptake,

basolateral efflux 及び biliary excretion 過程に対する CsA の阻害率 (%) を示す.  $I_{\max}$  は最大阻害率 (%) を示し,  $IC_{50}$  は  $I_{\max}$  に対して 50% の効果を示すときの CsA 濃度,  $\gamma$  はヒル係数を示す. また,  $[I]$  は添加 CsA 濃度を示す. MPA 添加量は 300 pmol とし,  $k_{\text{uptake,MPAG}}$ ,  $k_{\text{efflux,MPAG}}$ ,  $k_{\text{bile,MPAG}}$  及び  $k_{\text{flow,MPAG}}$  は第三章 第四節の結果から, それぞれ  $0.0815 \text{ min}^{-1}$ ,  $6.02 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.228 \text{ min}^{-1}$  及び  $0.0403 \text{ min}^{-1}$  とした (表 5) .

更に, 以下の微分方程式及び陽関数によって, MPA 添加後のサンドイッチ培養ヒト肝細胞における MPAG 肝動態に対する CsA の阻害パラメータを推定した. なお, 第四章 第一節及び第二節の結果から, CsA は MPA の肝動態及び MPA から MPAG へのグルクロン酸抱合代謝を阻害しないと仮定した.

$$\begin{aligned}\frac{dX_{MPA,m}}{dt} &= -k_{\text{uptake,MPA}} \times X_{MPA,m} \\ \frac{dX_{MPAG,m}}{dt} &= k_{\text{efflux,MPAG}} \times X_{MPAG,c} \times (1 - I_{\text{efflux}}) - k_{\text{uptake,MPAG}} \times X_{MPAG,m} \\ &\quad \times (1 - I_{\text{uptake}}) + k_{\text{flow,MPAG}} \times X_{MPAG,b} \\ \frac{dX_{MPA,c}}{dt} &= k_{\text{uptake,MPA}} \times X_{MPA,m} - k_{\text{metabolism,MPA}} \times X_{MPA,c} \\ \frac{dX_{MPAG,c}}{dt} &= k_{\text{metabolism,MPA}} \times X_{MPA,c} + k_{\text{uptake,MPAG}} \times X_{MPAG,m} \times (1 - I_{\text{uptake}}) \\ &\quad - \{k_{\text{efflux,MPAG}} \times (1 - I_{\text{efflux}}) + k_{\text{bile}} \times (1 - I_{\text{bile}})\} \times X_{MPAG,c} \\ \frac{dX_{MPAG,b}}{dt} &= k_{\text{bile,MPAG}} \times X_{MPAG,c} \times (1 - I_{\text{bile}}) - k_{\text{flow,MPAG}} \times X_{MPAG,b} \\ I_{\text{uptake}} &= \frac{I_{\max,\text{uptake}} \times [I]^{\gamma_{\text{uptake}}}}{IC_{50,\text{uptake}}^{\gamma_{\text{uptake}}} + [I]^{\gamma_{\text{uptake}}}} \\ I_{\text{efflux}} &= \frac{I_{\max,\text{efflux}} \times [I]^{\gamma_{\text{efflux}}}}{IC_{50,\text{efflux}}^{\gamma_{\text{efflux}}} + [I]^{\gamma_{\text{efflux}}}} \\ I_{\text{bile}} &= \frac{I_{\max,\text{bile}} \times [I]^{\gamma_{\text{bile}}}}{IC_{50,\text{bile}}^{\gamma_{\text{bile}}} + [I]^{\gamma_{\text{bile}}}}\end{aligned}$$

ここで,  $k_{\text{metabolism}}$  は細胞内代謝 (intracellular metabolism) 過程の一次速度定数を示す. MPA 添加量は 300 pmol とし,  $k_{\text{uptake,MPA}}$ ,  $k_{\text{metabolism,MPA}}$ ,  $k_{\text{uptake,MPAG}}$ ,  $k_{\text{efflux,MPAG}}$ ,  $k_{\text{bile,MPAG}}$  及び  $k_{\text{flow,MPAG}}$  は 第二章 第四節の結果から, それぞれ  $0.0381 \text{ min}^{-1}$ ,  $1.58 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0111 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.143 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0591 \text{ min}^{-1}$  及び  $0.122 \text{ min}^{-1}$  とした (表 5) . また, 肝細胞内からバッファーへの MPAG の移行速度がバッファーから肝細胞内への MPAG の取り込み速度よりも速く, MPAG の肝取り込み過程に対する阻害パラメータを推定することが出来ないため,  $I_{\max,\text{uptake}}$ ,  $IC_{50,\text{uptake}}$  及び  $\gamma_{\text{uptake}}$  は MPAG 添加時の阻害パラメータを用いた.

## 第二項 結果

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPAG を 0~50  $\mu$  mol/L の CsA と同時に添加し、得られたバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPAG から推定した CsA の阻害パラメータを表 6 に示す。

MPAG の肝取り込みには CsA で阻害される OATP1B1 及び OATP1B3 が関与すると報告されているが<sup>87)</sup>、CsA の  $I_{\max, \text{uptake}}$  は 32.4%と推定された。このことから、MPAG の肝取り込みに関与するヒト OATPs の寄与は約 30%と考えられた。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPA を 0~50  $\mu$  mol/L の CsA と同時に添加し、得られたバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の MPA 及び MPAG から推定した CsA の阻害パラメータを表 7 に示す。なお、 $IC_{50, \text{uptake}}$ 、 $I_{\max, \text{uptake}}$  及び  $\gamma_{\text{uptake}}$  は表 6 の結果を用いた。

肝細胞内で生成した MPAG の basolateral efflux 過程に対する CsA の  $IC_{50}$  及び  $I_{\max}$  はそれぞれ 11.8  $\mu$  mol/L 及び 51.6%と推定された。一方、ヒト肝細胞内で生成した MPAG の biliary excretion 過程に対する CsA の  $IC_{50}$  及び  $I_{\max}$  はそれぞれ 3.62  $\mu$  mol/L 及び 83.1%と推定され、 $IC_{50, \text{bile}}$  は  $IC_{50, \text{efflux}}$  よりも低く、 $I_{\max, \text{bile}}$  は  $I_{\max, \text{efflux}}$  よりも高かった。この結果は、CsA はヒト肝細胞中で、MPAG の basolateral efflux 過程よりも biliary excretion 過程に対してより強い阻害作用を示していることを示唆するものであった。

得られた CsA の阻害パラメータ推定値から、CsA 濃度と各輸送過程に対する阻害率をシミュレーションした結果を図 24 に示す。なお、MPAG の basolateral efflux 及び biliary excretion 過程に対する CsA の阻害パラメータは表 7 の結果を用いた。

MPAG の basolateral efflux 過程に対して、CsA は 5  $\mu$  mol/L まで阻害しなかった。一方、MPAG の basolateral uptake 及び biliary excretion 過程は CsA が 0.1  $\mu$  mol/L 以上の濃度で阻害を受け、1  $\mu$  mol/L 以上の濃度では basolateral uptake よりも biliary excretion 過程の方がより強く阻害を受けるシミュレーション結果が得られた。

**表 6 Inhibitory parameter estimates of CsA for MPAG hepatic disposition after incubating MPAG with sandwich-cultured human hepatocytes**

Process	Parameter	Estimate	%RSE
Basolateral uptake	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	1.95	0.0
	I <sub>max</sub> (%)	32.4	0.0
	γ	0.777	0.0
Basolateral efflux	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	2.55	0.1
	I <sub>max</sub> (%)	67.4	0.1
	γ	1.09	1.0
Biliary excretion	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	2.04	0.8
	I <sub>max</sub> (%)	77.1	0.1
	γ	1.94	0.5

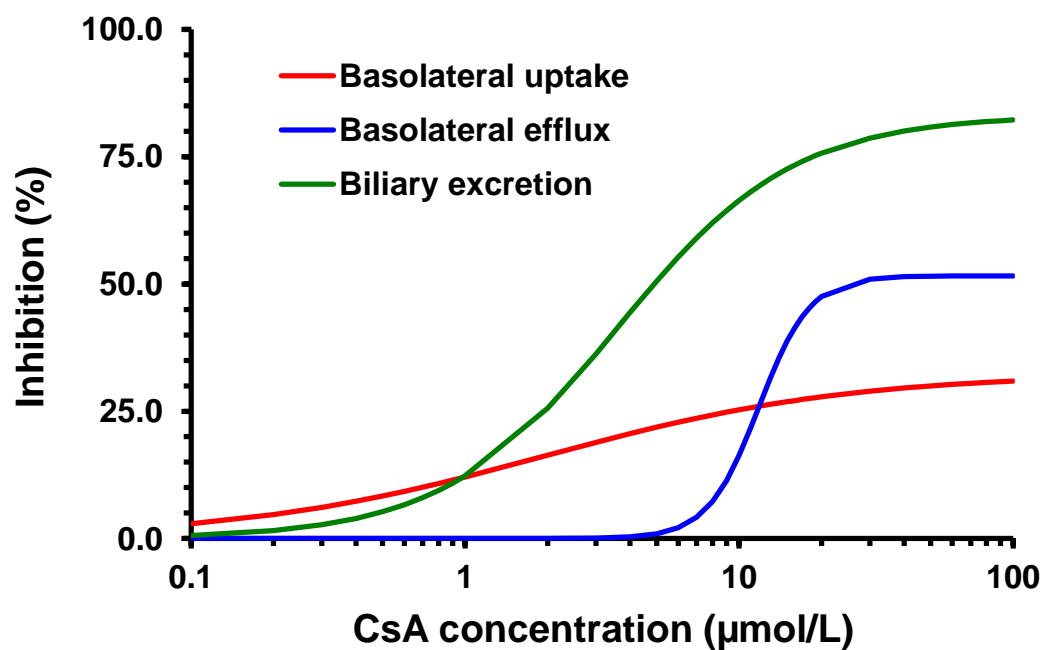
Inhibitory parameters were estimated using NONMEM (subroutine ADVAN 13) of data from mass balance–time profiles of hepatic disposition of MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes.

**表 7 Inhibitory parameter estimates of CsA for MPAG hepatic disposition after incubating MPA with sandwich-cultured human hepatocytes**

Process	Parameter	Estimate	%RSE
Basolateral uptake	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	1.95	FIXED
	I <sub>max</sub> (%)	32.4	FIXED
	γ	0.777	FIXED
Basolateral efflux	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	11.8	8.6
	I <sub>max</sub> (%)	51.6	7.4
	γ	4.65	7.7
Biliary excretion	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	3.62	32.3
	I <sub>max</sub> (%)	83.1	4.5
	γ	1.36	36.0

Inhibitory parameters were estimated using NONMEM (subroutine ADVAN 13) of data from mass balance–time profiles of hepatic disposition of MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes.

☒ 24 Simulation of CsA inhibition of basolateral uptake, basolateral efflux, and biliary excretion of MPAG



Each line shows the median of percent inhibition of CsA for basolateral uptake, basolateral efflux, and biliary excretion of MPAG in sandwich-cultured human hepatocytes.

#### 第四節 小括

サンドイッチ培養ヒト肝細胞は薬物代謝と胆汁中排泄を含めた薬物輸送の両機能を維持し、肝臓における薬物動態を模倣できる有益な試験系である。このため、未変化体と代謝物の肝動態評価だけでなく、その肝動態過程に対する阻害剤の影響についても、同時に評価出来る試験系と考えられる。本章では、臨床で MPA と薬物間相互作用が報告されている CsA について、サンドイッチ培養肝細胞を用いた *in vitro* 相互作用試験を実施し、その阻害の影響を既に構築した肝動態モデルを用いて推定した。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に MPA あるいは MPAG を CsA と同時に添加したとき、MPAG の BEI はいずれも CsA の濃度依存的に低下した。BEI は肝細胞中と毛細胆管腔中の化合物量比によって決定されるため、basolateral uptake 及び basolateral efflux 過程への影響を無視できる場合は、BEI の阻害率を biliary excretion の阻害率と見なすことが出来る。しかし、MPAG の場合は肝臓への取り込みにはヒト OATPs が<sup>87)</sup>、体循環への移行にはヒト MRP3 及び MRP4 が関与していることが明らかとなっており。また、これらトランスポーターに対して CsA は阻害作用を有していることから<sup>91), 94)</sup>、BEI を指標として MPAG の biliary excretion 過程に対する CsA の阻害を評価することは不適と考えられた。このように、BEI は biliary excretion 以外の輸送あるいは代謝過程の変動によっても影響を受けるため、毛細胆管腔中の蛍光強度の変動を quantitative time-lapse imaging (以下 QTLI) 法を用いて可視化し、canalicular membrane transporter に対する阻害を評価する方法も報告されている<sup>43), 44)</sup>。肝動態モデルに基づいた阻害パラメータの推定は、QTLI 法と同様に複数の肝動態過程が変動する場合でも評価可能であることから、今後、更なる検討が期待される。

阻害パラメータの推定において、CsA は MPA の輸送及び代謝に影響しないと仮定した。CsA が阻害作用を有する OATP1B1 あるいは OATP1B3 に対して、MPA は基質ではなく<sup>87)</sup>、また MPA と MPAG の *in vitro* 試験系中の物質収支は CsA によって影響を受けなかったこと(図 22)、並びにヒト肝ミクロソーム中での MPA から MPAG のグルクロン酸抱合代謝を CsA は阻害しなかったこと(図 23)から、これらの仮定は妥当と考えられた。

MPAG の basolateral uptake 過程に対する CsA の  $I_{\max}$  は 32.4%と推定された。第三章 第一節の結果から、MPAG の肝取り込み過程におけるヒト肝取り込みトランスポーターの関与は約 1/4 程度であることが示唆されており、本章で推定された  $I_{\max}$  はその結果に近いものであった。肝取り込みトランスポーターの関与を評価する *in vitro* 試験系には、一般に浮遊肝細胞系が用いられ、4℃での薬物の取り込み量に対する 37℃での取り込み量の差が、肝取り込みトランスポーター依存的な取り込み量として評価される。しかし、トランスポーターによる担体介在輸送が関与しない膜透過速度も温度によって影響を受けることから<sup>39)</sup>、温度依存性とは異なる評価方法、すなわち阻害剤を用いた評価や、酵素キネティクス検討も行われ

ている。また、サンドイッチ培養肝細胞と浮遊肝細胞の大きな違いは basolateral uptake 及び intracellular metabolism 過程だけでなく、basolateral efflux 及び biliary excretion 過程もサンドイッチ培養肝細胞では評価できる点が挙げられる。このため、肝動態の全過程を同時に評価可能なサンドイッチ培養肝細胞中での肝動態をモデル化し、阻害剤の影響を推定する方法は、薬物動態研究において非常に有益な評価方法と考えられる。

ヒト肝細胞内で生成した MPAG の basolateral efflux 過程に対する CsA の  $I_{\max}$  は 51.6% と推定されたことから、MPAG の体循環への移行に関与するヒト MRP3 及び MRP4 の寄与は約 50% と考えられた。一方、ヒト肝細胞内で生成した MPAG の biliary excretion 過程に対する CsA の  $I_{\max}$  は 83.1% と、MPAG の胆汁中排泄にはヒト MRP2 による排泄が主に関与していることが明らかとなった。

モデル解析に用いた阻害剤 (CsA) の濃度はバッファー添加濃度に基づいているため、肝取り込みや代謝、体循環への移行や胆汁中排泄に対する影響を全てバッファー中添加濃度 (*in vivo* では血中濃度に対応) を基に考察することが出来る。MPAG の輸送過程に対する CsA の  $IC_{50}$  は、basolateral uptake ( $1.95 \mu\text{mol/L}$ )、biliary excretion ( $3.62 \mu\text{mol/L}$ )、basolateral efflux ( $11.8 \mu\text{mol/L}$ ) の順であった。ヒト肝細胞あるいは発現細胞を用いたこれまでの検討から、CsA のヒト OATP1B1/OATP1B3 に対する  $IC_{50}$  は  $0.06 \sim 2.2 \mu\text{mol/L}$  と報告されている<sup>91)</sup>。また、MPAG とは異なる基質 (carboxy-dichlorofluorescein) を用いたサンドイッチ培養ヒト肝細胞中でのヒト MRP2 に対する CsA の  $IC_{50}$  は  $3.4 \mu\text{mol/L}$ <sup>95)</sup>、ヒト MRP2 を過剰発現させた膜ベシクルを用いた検討では MPAG の取り込みに対する CsA の  $IC_{50}$  は  $8 \mu\text{mol/L}$  と報告されている<sup>96)</sup>。更に、ヒト MRP3 あるいは MRP4 を過剰発現させた膜ベシクル試験において、CsA の  $IC_{50}$  はヒト MRP3 (基質:  $^3\text{H}$ -17 $\beta$ -エストラジオールグルクロニド) 及び MRP4 (基質:  $^3\text{H}$ -硫酸デヒドロエピアンドロステロン) に対してそれぞれ  $106 \mu\text{mol/L}$  及び  $23 \mu\text{mol/L}$  と報告されている<sup>94)</sup>。異なる基質を用いた  $IC_{50}$  の比較、膜ベシクル系と細胞系といった試験系の違いを考慮する必要はあるが、モデル解析によって推定された  $IC_{50}$  は既報と比べて大きく異なることが確認でき、また、その阻害強度の順も妥当であると考えられた。

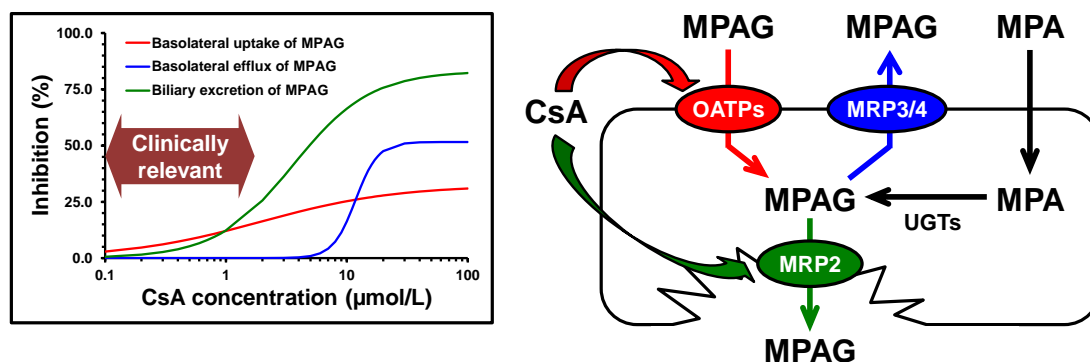
数理モデル解析によって推定された阻害パラメータから、CsA 濃度に応じた MPAG の各輸送過程に対する阻害率をシミュレーションしたところ、basolateral efflux 過程は  $5 \mu\text{mol/L}$  以上の CsA で阻害される一方、basolateral uptake 及び biliary excretion 過程はより低濃度から阻害される結果が得られた。腎移植患者における CsA の平均最大血中濃度及び血中トラフ濃度はそれぞれ  $1880 \text{ ng/mL}$  (約  $1.56 \mu\text{mol/L}$ ) 及び  $251 \text{ ng/mL}$  (約  $0.2 \mu\text{mol/L}$ ) と報告されている<sup>97)</sup>。また、肝取り込みトランスポーターにおける薬物間相互作用の評価においては、

臨床での予想最大非結合形濃度に基づくカットオフ基準（R 値）の考え方が、各規制当局からのガイダンス/ガイドラインに記載されている<sup>3) -5)</sup>。R 値は以下の計算式から算出される。

$$R = 1 + \frac{f_u \times I_{inlet,max}}{K_i}$$

ここで、 $f_u$  は蛋白非結合形分率、 $I_{inlet,max}$  は肝臓入口における阻害剤の予想最大濃度、 $K_i$  は阻害定数を示す。CsA の OATP1B1 に対する R 値及び  $K_i$  はそれぞれ 3.55 及び  $0.242 \mu\text{mol/L}$  と報告されていることから<sup>98)</sup>、肝臓入口における CsA の予想最大非結合形濃度は  $0.617 \mu\text{mol/L}$  と逆算できる。更に、CsA の血中動態の個体差並びに用法・用量幅（腎移植患者の初期投与量： $9 \pm 3 \text{ mg/kg/日}$ 、肝移植患者の初期投与量： $8 \pm 4 \text{ mg/kg/日}$ 、心臓移植患者の初期投与量： $7 \pm 3 \text{ mg/kg/日}$ ）を考慮すると<sup>99)</sup>、 $0.2 \sim 1.5 \mu\text{mol/L}$  の濃度が CsA の臨床的な濃度と考えられた。これらのことから、**図 25** に示すように、CsA は臨床的な濃度においては MPAG の体循環への移行を阻害しない一方、MPAG の肝取り込み及び胆汁中への排泄を阻害し、MPAG の腸肝循環を抑制することで、MPA の血漿中トラフ濃度が低下させることが考えられた。また有意ではないが、CsA 併用によって血漿中 MPAG 濃度が上昇する傾向が認められている<sup>100), 101)</sup>。これも CsA による MPAG の basolateral uptake 及び biliary excretion 過程の阻害に基づくものと考えられた。更に、CsA のヒト肝取り込みトランスポーターに対する阻害作用がプレインキュベーション依存的に強くなること（時間依存的阻害作用）が最近報告されており<sup>102)</sup>、その一部は CsA の代謝物の影響とも報告されている<sup>103)</sup>。本章における検討では、CsA は MPA あるいは MPAG と同時に添加したときの阻害パラメータを推定したものであるが、CsA をサンドイッチ培養ヒト肝細胞とプレインキュベーションすることで、細胞内 CsA 濃度あるいは細胞内で生成した CsA の代謝物の影響が更に強くなる可能性も否定できない。このため今後、本内容に関する更なる研究が期待される。

**図 25 Drug-drug interaction between MPA and CsA at clinically relevant concentrations**



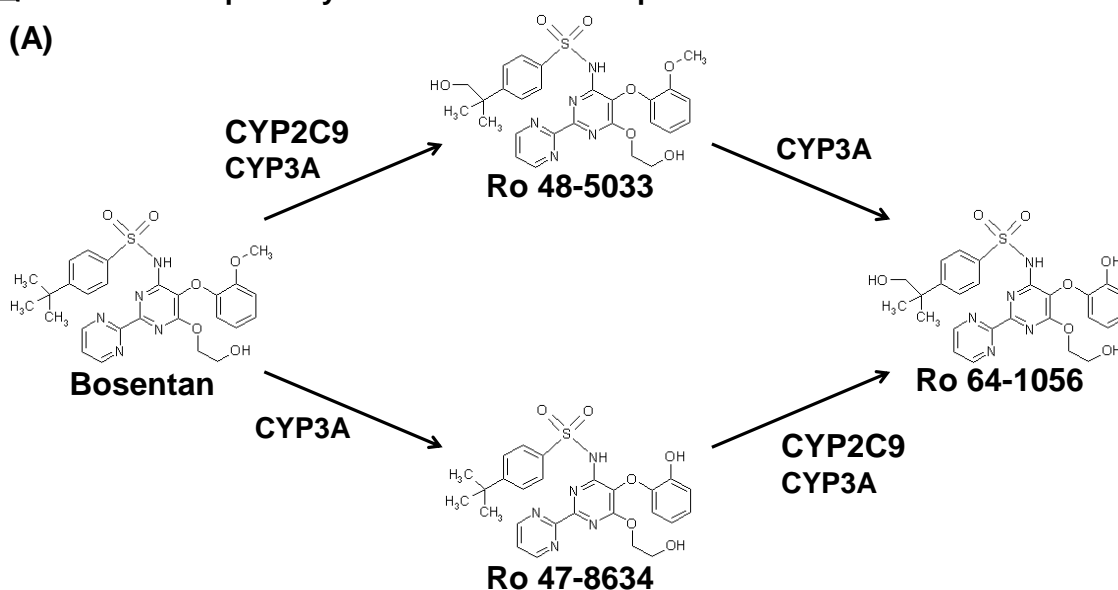


## 第五章 Bosentan 及び代謝物の肝動態モデリング

非選択的エンドセリン受容体拮抗薬である Bosentan は、肺性高血圧症治療薬として使用されている<sup>104)</sup>。図 26A に示すように、bosentan の代謝には CYP2C9 及び CYP3A が関与しており、CYP2C9 は *t*-buthyl 基の水酸化に特異的に関与し、CYP3A は *t*-buthyl 基の水酸化とともに、methyl phenyl ether 基の脱メチル化にも関与している<sup>105) -107)</sup>。健康成人に bosentan (62.5 mg) を単回経口投与後の血漿中 bosentan 及び代謝物の薬物動態パラメータを図 26B に示す。血漿中の主成分は未変化体 (bosentan) であり、代謝物の中では Ro 48-5033 が最も血中曝露が多く、次いで Ro 64-1056, Ro 47-8634 の順となる<sup>106)</sup>。放射性標識体を用いたヒトにおけるマスバランス試験では、単回静脈内投与後に尿中及び糞中に未変化体 (bosentan) として排泄された量は投与量の 5%未満であり、また尿中へ排泄された放射エネルギーも投与量の 5%程度と報告されている<sup>107)</sup>。これらは、bosentan は肝代謝によって消失し、肝臓内で生成した代謝物は体循環にあまり移行せず、胆汁を介して糞中へ排泄されることを示している。

図 26 Metabolic pathway of bosentan and their pharmacokinetics in humans

(A)



(B)

パラメータ	Bosentan	Ro 48-5033	Ro 47-8634	Ro 64-1056
Tmax(h)	4.5(3.5 – 6.0)	9.0(4.5 – 12.0)	4.5(4.5 – 6.0)	6.5(4.5 – 8.0)
Cmax(ng/mL)	617(504, 755)	34.4(26.7, 44.5)	11.3(8.6, 14.8)	28.4(23.4, 34.5)
T1/2(h)	5.4(4.5, 6.6)	14.2(9.6, 21.0)	4.5(3.6, 5.5)	4.0(3.2, 5.1)
AUCinf(ng*h/mL)	4234(3597, 4985)	522(401, 681)	98.4(79.3, 122)	283(244, 328)

Data are expressed as geometric mean (and 95% confidence interval) or, for Tmax, as median (and range).

(引用文献 105) ~107) を改変)

## 第一節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での bosentan 及び代謝物の肝動態

第三章では肝臓内で生成した代謝物が体循環に多く移行するモデル薬物として MPA を用いた。本章では肝臓内で生成した代謝物が体循環にあまり移行せず、胆汁中に排泄されるモデル薬物として bosentan を選択した。本節ではまず、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での bosentan 及びその代謝物の *in vitro* 肝動態を検討し、更に bosentan の主代謝物である Ro 48-5033 について、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での BEI の評価及び canalicular membrane transporter の基質認識性を検討した。


### 第一項 実験方法

第三章 第一節 第一項に記載したヒト凍結肝細胞（ロット IZT, GHA, RTM）を使用した。また、ヒト P-糖蛋白質（以下 P-gp）、MRP2, BCRP あるいは BSEP を過剰発現させた膜ベシクルは株式会社ジェノメンブレンから購入し、購入後速やかに使用した。bosentan, Ro 48-5033 及びそれらの *d* 体、並びに Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 は Toronto Research Chemicals Inc.から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを使用した。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた bosentan の肝動態試験において、細胞溶解液を得るまでの操作は第三章 第二節 第一項に準じた。Bosentan を基質とした場合、反応液中濃度は  $1\ \mu\text{mol/L}$  とし、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 3, 5, 10, 15, 20, 30 あるいは 45 分間静置した。Ro 48-5033 を基質とした場合、反応液中濃度は  $1\ \mu\text{mol/L}$  とし、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 10 分間静置した。

試料の前処理条件を以下に示す。

#### 前処理方法

- 
- ←ガラス試験管にメタノール  $200\ \mu\text{L}$ , Bosentan-*d*4 調製液 ( $50\ \mu\text{L}$ ) , Ro 48-5033-*d*4 調製液 ( $50\ \mu\text{L}$ ) 及び細胞溶解液又はバッファー ( $200\ \mu\text{L}$ ) を採取し、混合
  - ←水  $3\ \text{mL}$  で希釈
  - ←予めメタノール／水でプレコンディショニングした固相カラム (OasisHLB カートリッジ,  $3\ \text{mL}$ ,  $60\ \text{mg}$ ) に添加
  - ←水, 20%メタノールの順で洗浄
  - ←メタノールで溶出
  - ←濃縮遠心機を用いて減圧乾固
  - ←初期移動相 (10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.5) /アセトニトリル (7 : 3) 混液)  $150\ \mu\text{L}$  で再溶解
- 再溶解液  $10\ \mu\text{L}$  を LC/MS/MS で分析

ヒト ABC トランスポーター発現膜ベシクルを用いた Ro 48-5033 の基質認識性評価において、rapid filtration 法は第二章 第三節 第一項に準じた。Ro 48-5033 の反応液中濃度は 10  $\mu\text{mol/L}$  とし、37℃で 2 分間取り込みを行った。膜ベシクルの反応液中濃度はいずれも 1 mg/mL とし、氷冷した反応停止液で 5 回洗浄後の membrane filter は測定に供するまで - 80℃で保存した。

#### バッファー及び反応停止液の組成

内容		組成
P-gp	バッファー	50 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 7.5 mM 塩化マグネシウム, 70 mM 塩化カリウム, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP)
	反応停止液	40 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 70 mM 塩化カリウム
MRP2	バッファー	50 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 7.5 mM 塩化マグネシウム, 70 mM 塩化カリウム, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP) , 2 mM グルタチオン
	反応停止液	40 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 70 mM 塩化カリウム
BCRP	バッファー	50 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 7.5 mM 塩化マグネシウム, 70 mM 塩化カリウム, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP)
	反応停止液	40 mM MOPS-Tris バッファー (pH 7.0) , 70 mM 塩化カリウム
BSEP	バッファー	10 mM HEPES-Tris バッファー (pH 7.4) , 10 mM 硝酸マグネシウム, 100 mM 硝酸カリウム, 50 mM スクロース, 4 mM ATP (又は 4 mM AMP)
	反応停止液	10 mM HEPES-Tris バッファー (pH 7.4) , 100 mM 硝酸カリウム, 50 mM スクロース

試料の前処理条件を以下に示す。

#### 前処理方法

- ←Membrane filter をアセトニトリル (300  $\mu\text{L}$ ) で溶解
- ←水 (50  $\mu\text{L}$ ) , メタノール (300  $\mu\text{L}$ ) 及び Ro 48-5033-*d4* 調製液 (50  $\mu\text{L}$ ) を添加し, membrane filter を析出させた後, 遠心 (約 10000g, 5 分)
- ←遠心上清をガラス試験管に採取
- ←濃縮遠心機を用いて減圧乾固
- ←初期移動相 (10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.5) /アセトニトリル (7 : 3) 混液) 80  $\mu\text{L}$  で再溶解

再溶解液 10  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS で分析

LC-MS システムの制御及びデータ処理には Analyst version 1.4.1 を使用した。検量線範囲は Ro 64-1056 以外は 1~1000 nmol/L とし, Ro 64-1056 は 1~500 nmol/L とした。検量線試料及び QC 試料の判定基準は第三章 第一節 第一項に準じた。

## LC-MS/MS 条件

HPLC システム : 1100 series  
カラム : Synergi Polar RP, 4  $\mu$  m, 150  $\times$  2.0 mm ID (Phenomenex)  
カラム温度 : 40°C  
オートサンプラー温度 : 4°C  
移動相 :

A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.5)

B) アセトニトリル

Time (min)	% A	% B
0	70	30
1	70	30
7	10	90
8	10	90
9	70	30
14	70	30

流速 : 400  $\mu$  L/min

Ion source : Turbo Spray

Scan type : MRM

Scan time : 150 msec

Polarity : Positive

Analyte :	monitor ion ( $m/z$ )	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Bosentan	552.3 $\rightarrow$ 202.1	106	45	14
Bosentan- <i>d4</i>	556.1 $\rightarrow$ 202.0	106	45	14
Ro 48-5033	568.3 $\rightarrow$ 202.1	106	45	14
Ro 48-5033- <i>d4</i>	572.3 $\rightarrow$ 202.0	106	45	14
Ro 47-8634	538.1 $\rightarrow$ 189.0	106	45	14
Ro 64-1056	554.3 $\rightarrow$ 189.0	106	45	14

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた検討では、バッファー及び細胞溶解液濃度、並びに蛋白定量値から、バッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の bosentan 及びその代謝物 (Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056) の量的時間推移を求めた。また、Ro 48-5033 を基質とした検討では細胞溶解液中 Ro 48-5033 濃度と蛋白定量値から、蓄積量 (accumulation, pmol/mg protein) を算出した。BEI の算出は第二章 第二節 第一項に準じた。

膜ベシクルを用いた検討では、試料中 Ro 48-5033 濃度及び反応液中膜ベシクル濃度から、取り込み量 (uptake, pmol/2min/mg protein) を算出した。

## 第二項 統計解析

膜ベシクル試験における AMP 添加試料に対する ATP 添加試料の Ro 48-5033 の取り込み量について、第二章 第三節 第二項に準じた 2-sample t 検定を行った。

## 第三項 結果

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に  $1\ \mu\text{mol/L}$  の bosentan を添加後のバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 の経時的な量的推移を図 27 に示す。

バッファー中及び肝細胞中の bosentan は添加後 15 分以降はほぼ一定に推移した。Bosentan の蓄積量は Ca/Mg(+)条件下と Ca/Mg(-)条件下でほとんど差は認められなかったことから (data not shown) , bosentan は毛細胆管腔中へほとんど移行しないと考えられた。一方, bosentan の代謝物は、いずれもバッファー中及び毛細胆管腔中の経時的な増加が認められた (図 27C, E, F, H, I 及び K) 。したがって、ヒト肝細胞内で生成した bosentan の代謝物 (Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056) は血液側膜を介してバッファー中へ移行するとともに、胆管側膜を介して毛細胆管腔中へ移行すると考えられた。

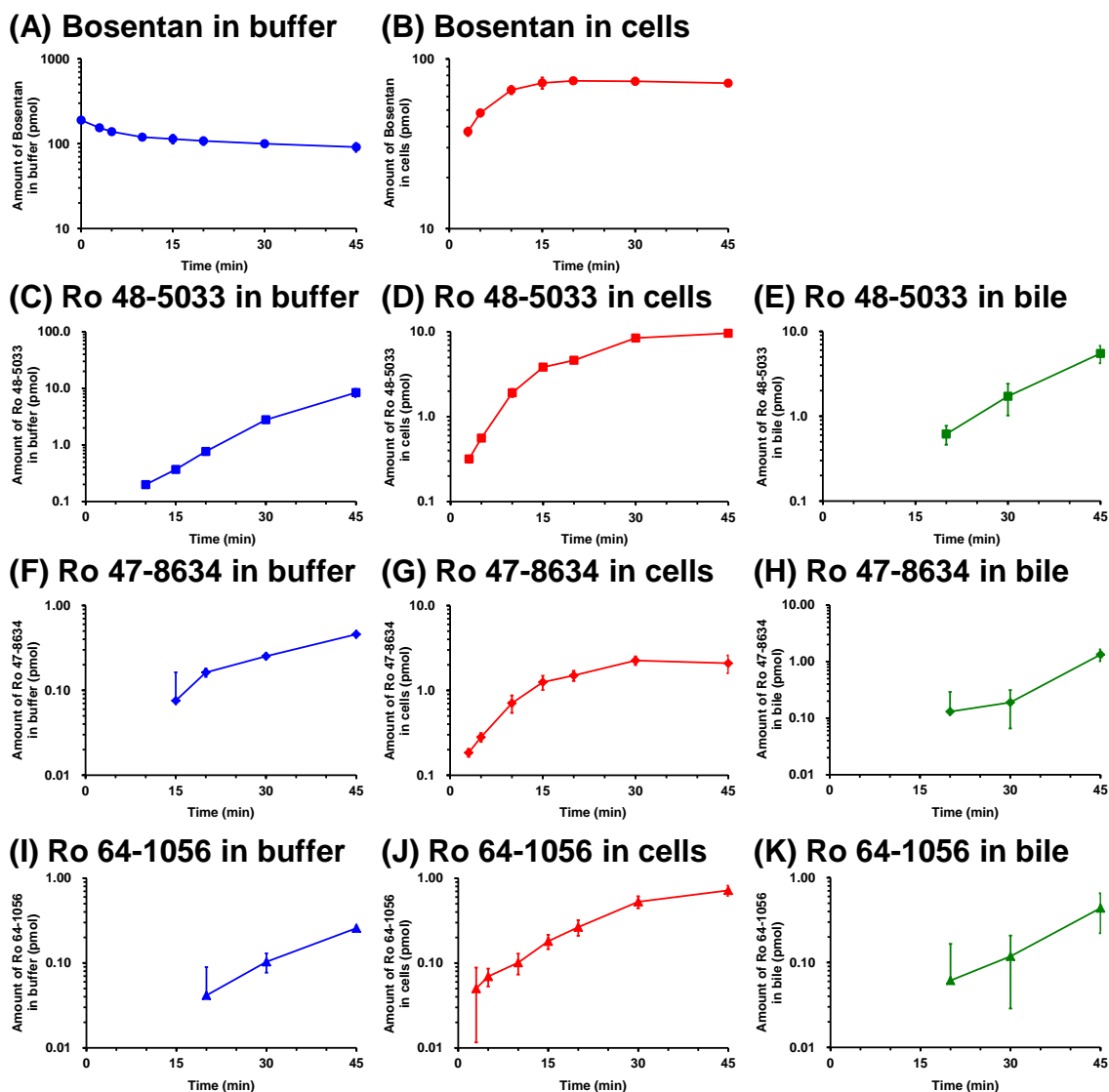
Bosentan を基質としたときに毛細胆管腔への移行が認められた代謝物の中で、ヒトでの主代謝物である Ro 48-5033 を用い、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での BEI を評価した。その結果を図 28 に示す。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞 3 ロットいずれにおいても、Ro 48-5033 の毛細胆管腔中への移行が認められ、BEI は 23.5~42.2%であった。このことは、サンドイッチ培養ヒト肝細胞に bosentan を添加後、肝細胞内で生成した Ro 48-5033 が毛細胆管腔中へ移行した結果と一致するものであった。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞中で毛細胆管腔中への移行が認められた Ro 48-5033 について、ATP あるいは AMP 存在下における各 ABC トランスポーター発現膜ベシクルへの取り込みを検討した。その結果を図 29 に示す。

ヒト P-gp あるいは BSEP を過剰発現させた膜ベシクルへの Ro 48-5033 の ATP 存在下の取り込み量は、AMP 存在下と変わらなかった。一方、ヒト MRP2 あるいは BCRP を過剰発現させた膜ベシクルへの Ro 48-5033 の取り込み量は、ATP 存在下で有意に高かった。このことから、Ro 48-5033 はヒト MRP2 及び BCRP の基質であり、これら胆管側膜トランスポーターによって Ro 48-5033 は胆汁中へ排泄されると考えられた。

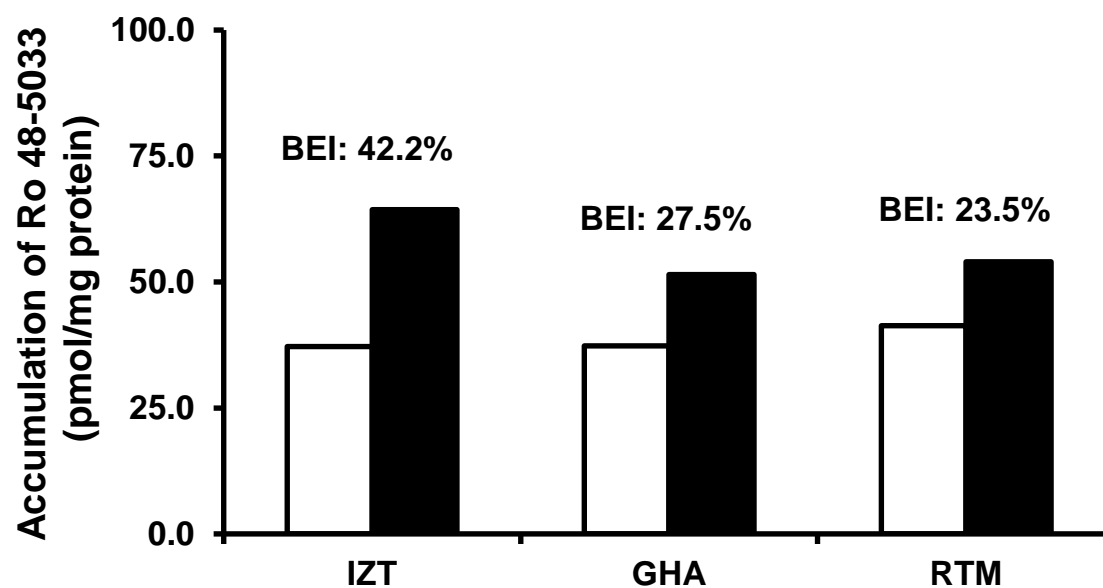
☒ 27 Mass–time profiles of bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634, and Ro 64-1056 in sandwich-cultured human hepatocytes



Bosentan(1  $\mu$ mol/L) was incubated with SCHH for 3, 5, 10, 15, 20, 30, or 45 min in  $\text{Ca}^{2+}(+)$  or  $\text{Ca}^{2+}(-)$  buffer. Data represent the mean  $\pm$  S.D. from four independent experiments with one lot of human hepatocytes (IZT).

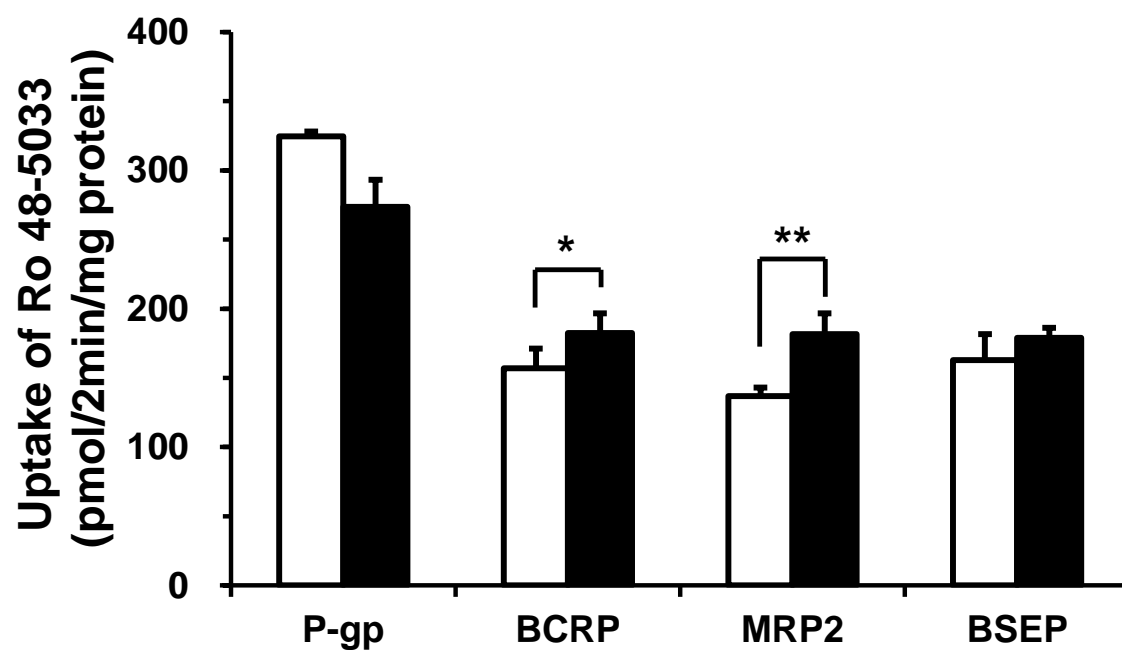
- , bosentan in buffer; ●, bosentan in hepatocytes;
- , Ro 48-5033 in buffer; ■, Ro 48-5033 in hepatocyte; ■, Ro 48-5033 in bile canaliculi
- ◆, Ro 47-8634 in buffer; ◆, Ro 47-8634 in hepatocyte; ◆, Ro 47-8634 in bile canaliculi
- ▲, Ro 64-1056 in buffer; ▲, Ro 64-1056 in hepatocyte; ▲, Ro 64-1056 in bile canaliculi

☒ 28 BEIs of Ro 48-5033 in sandwich-cultured human hepatocytes



Sandwich-cultured human hepatocytes were incubated with 1  $\mu\text{mol/L}$  Ro 48-5033 for 10 min in  $\text{Ca}^{2+}(+)$  or  $\text{Ca}^{2+}(-)$  buffer. Solid and open bar represent the mean value of two independent experiments in  $\text{Ca}^{2+}(+)$  and  $\text{Ca}^{2+}(-)$  condition, respectively. Data represent the BEI of three lots of human hepatocytes (IZT, GHA, and RTM).

Figure 29 Uptake of Ro 48-5033 by membrane vesicles expressing human P-gp, MRP2, BCRP, or BSEP



Uptake of Ro 48-5033 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) by membrane vesicles (1 mg/mL) was measured at 37°C for 2 min in the presence of ATP (solid bar) or AMP (open bar). Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three or four independent determinations.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  for ATP versus AMP (2-sample t test)



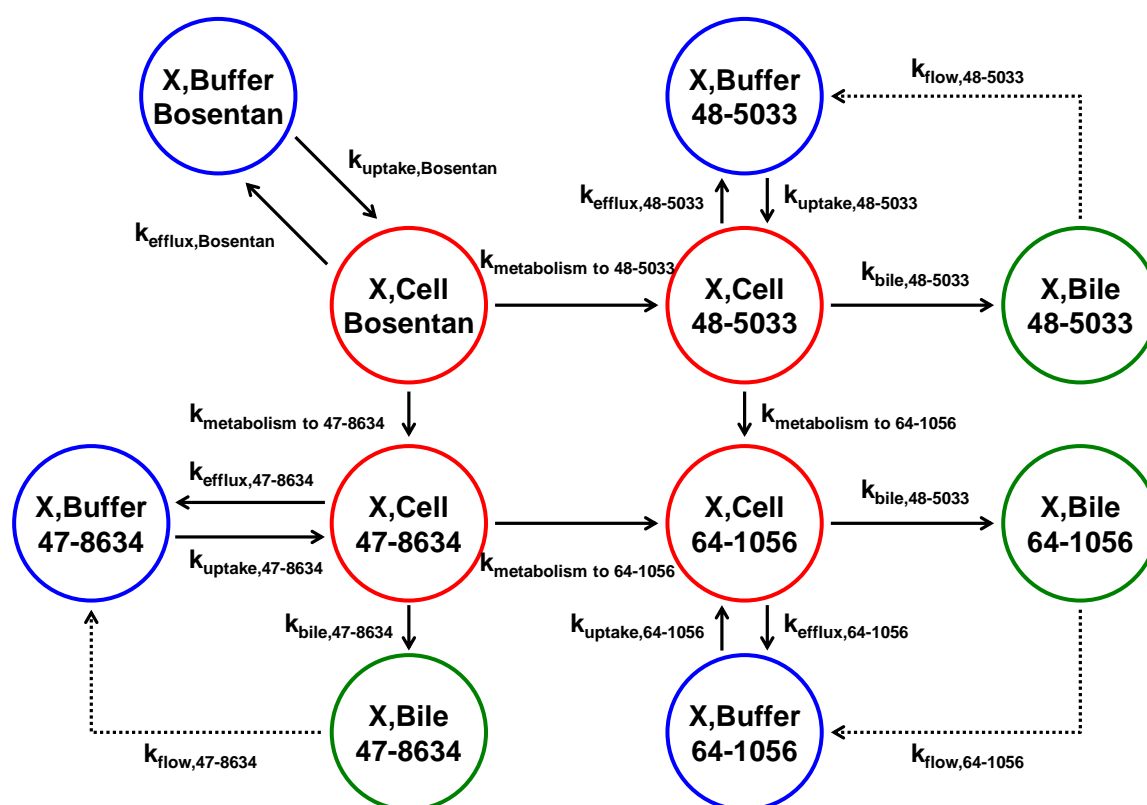
## 第二節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞中の bosentan 及び代謝物の肝動態モデリング

第五章 第一節で得られたサンドイッチ培養ヒト肝細胞中の bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 の量的時間推移を基に, モデル解析を行った.

### 第一項 解析方法

第五章 第一節で得られたバッファー中, 肝細胞中及び毛細胆管腔中の bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 のデータを用いた. 解析には NONMEM version 7.1.2 を用い, subroutine は ADVAN 13 を使用した. モデル式を図 30 に示す. なお, 第三章 第四節で明らかとなったように, 毛細胆管腔中からバッファーへの漏出 (flow) 過程を組み込む方がよりモデル式として妥当と判断し, 各代謝物について毛細胆管腔中からの漏出が存在すると仮定した.

図 30 Schema of nonlinear mixed effect models for hepatic disposition of bosentan and its metabolites in sandwich-cultured human hepatocytes



$k_{\text{uptake}}$ ,  $k_{\text{efflux}}$ ,  $k_{\text{bile}}$  and  $k_{\text{flow}}$  are the first-order rate constants for uptake, basolateral efflux, biliary excretion, and flow from the bile canaliculi to the buffer of bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634, or Ro 64-1056, respectively.  $k_{\text{metabolism}}$  is the first-order rate constant of intracellular metabolism.

以下の微分方程式によって、bosentan 添加後のサンドイッチ培養ヒト肝細胞における各一次速度定数を推定した。

$$\begin{aligned}
\frac{dX_{Bosentan,m}}{dt} &= -k_{uptake,Bosentan} \times X_{Bosentan,m} + k_{efflux,Bosentan} \times X_{Bosentan,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 48-5033,m}}{dt} &= -k_{uptake,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,m} + k_{efflux,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,c} \\
&\quad + k_{flow,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,b} \\
\frac{dX_{Ro\ 47-8634,m}}{dt} &= -k_{uptake,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,m} + k_{efflux,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,c} \\
&\quad + k_{flow,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,b} \\
\frac{dX_{Ro\ 47-8634,m}}{dt} &= -k_{uptake,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,m} + k_{efflux,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,c} \\
&\quad + k_{flow,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,b} \\
\frac{dX_{Bosentan,c}}{dt} &= k_{uptake,Bosentan} \times X_{Bosentan,m} \\
&\quad - (k_{metabolism\ to\ Ro\ 48-5033} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 47-8634} + k_{efflux,Bosentan}) \\
&\quad \times X_{Bosentan,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 48-5033,c}}{dt} &= k_{uptake,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,m} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 48-5033} \times X_{Bosentan,c} \\
&\quad - (k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} + k_{efflux,Ro\ 48-5033} + k_{bile,Ro\ 48-5033}) \\
&\quad \times X_{Ro\ 48-5033,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 47-8634,c}}{dt} &= k_{uptake,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,m} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 47-8634} \times X_{Bosentan,c} \\
&\quad - (k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} + k_{efflux,Ro\ 47-8634} + k_{bile,Ro\ 47-8634}) \\
&\quad \times X_{Ro\ 47-8634,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 64-1056,c}}{dt} &= k_{uptake,Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 64-1056,m} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 48-5033,c} \\
&\quad + k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 47-8634,c} \\
&\quad - (k_{efflux,Ro\ 64-1056} + k_{bile,Ro\ 64-1056}) \times X_{Ro\ 64-1056,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 48-5033,b}}{dt} &= k_{bile,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,c} - k_{flow,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,b} \\
\frac{dX_{Ro\ 47-8634,b}}{dt} &= k_{bile,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,c} - k_{flow,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,b} \\
\frac{dX_{Ro\ 64-1056,b}}{dt} &= k_{bile,Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 64-1056,c} - k_{flow,Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 64-1056,b}
\end{aligned}$$

ここで、 $k_{uptake}$ 、 $k_{efflux}$  及び  $k_{bile}$  はそれぞれ血液側から肝細胞内への取り込み（basolateral uptake），肝細胞内から血液側への排出（basolateral efflux）及び肝細胞内から胆汁中への排泄（biliary excretion）過程の一次速度定数を示す。 $k_{metabolism}$  は細胞内代謝（intracellular metabolism）過程の一次速度定数を示す。 $k_{flow}$  は毛細胆管腔からバッファーへの漏出（flow）の一次速度定数を示す。 $X$  は bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 あるいは Ro 64-1056 の各コ

ンパートメントにおける量を示し、付随する  $m$ ,  $c$  及び  $b$  はそれぞれ外部メディウム（バッファー）、肝細胞及び毛細胆管腔を意味する。

得られたパラメータ推定値を基に各時点の bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 を予測し、実測値との比較を行った。

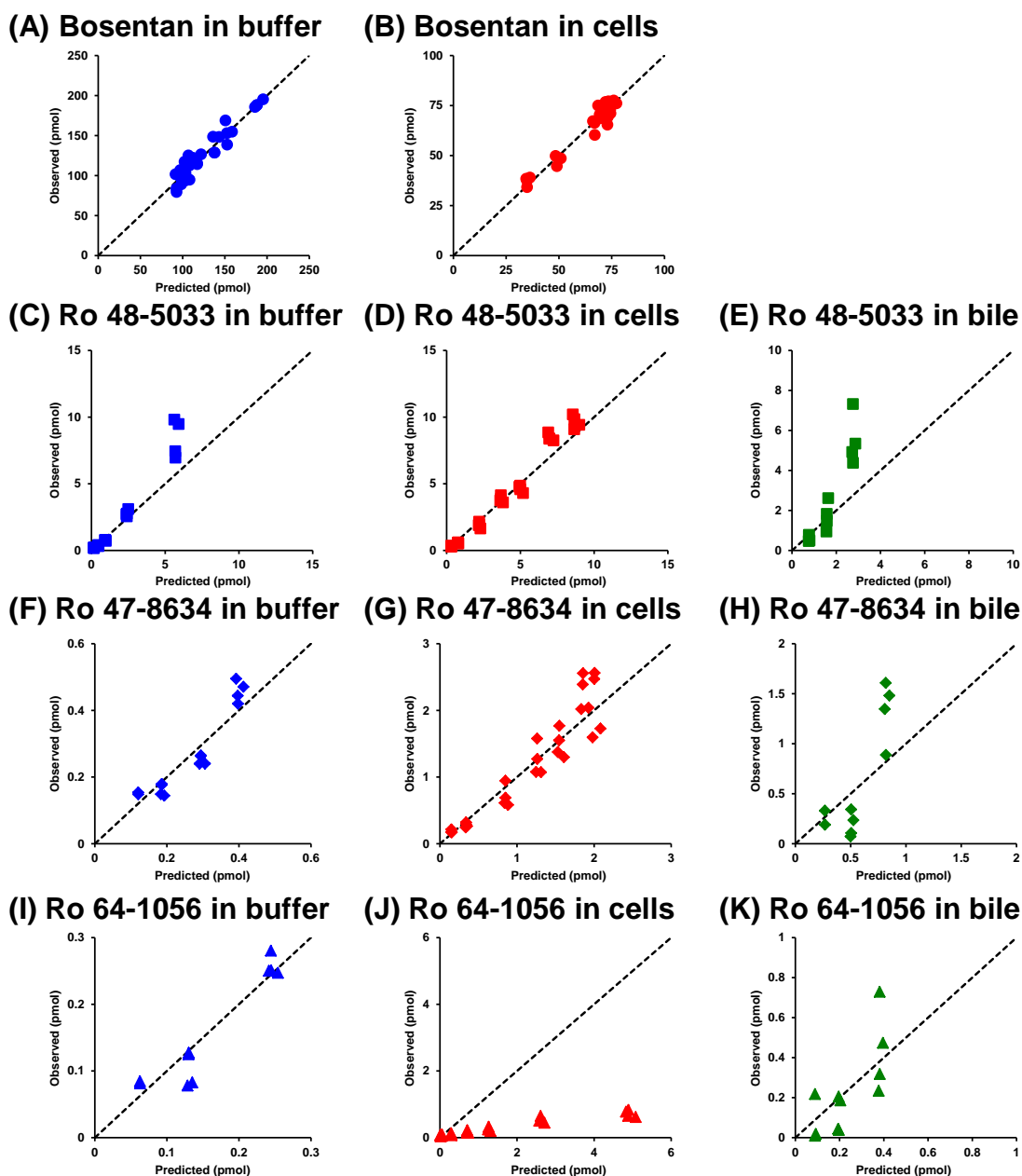
## 第二項 結果

Bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 のバッファー中、肝細胞中及び毛細胆管腔中の経時的な量的推移から、**図 30** に示したモデルに基づいて、一次速度定数を推定した。得られたパラメータ推定値から求めた各時点の予測値と実測値のスクアッタープロットを**図 31** に示す。

Bosentan のバッファー中（**図 31A**）及び肝細胞中（**図 31B**）、Ro 48-5033 及び Ro 47-8634 のバッファー中（**図 31C** 及び **F**）、肝細胞中（**図 31D** 及び **G**）及び毛細胆管腔中（**図 31E** 及び **H**）の予測値は、実測値とほぼ一致するものであった。また、Ro 64-1056 のバッファー中（**図 31I**）及び毛細胆管腔中（**図 31K**）の予測値も、同様に実測値とほぼ一致するものであった。これに対し、肝細胞中 Ro 64-1056 の予測値のみが実測値よりも過大に評価される結果が得られた（**図 31J**）。この結果を説明するためには、以下に示すような 3 つの仮説が考えられた。

- Ro 64-1056 はヒト肝細胞中で更に代謝されるにも関わらず、Ro 64-1056 が最終代謝物となるモデルになっているため、肝細胞中 Ro 64-1056 量が過大評価された。
- Ro 48-5033 のヒト肝細胞中での代謝経路には、Ro 64-1056 以外に未同定の代謝経路が存在し、その代謝経路が組み込まれていないモデルであるため、この代謝速度も Ro 64-1056 への代謝速度として推定され、肝細胞中 Ro 64-1056 量が過大評価された。
- 上記と同様に、Ro 47-8634 のヒト肝細胞中での代謝経路に未同定の代謝経路が存在し、肝細胞中 Ro 64-1056 量が結果的に過大評価された。

☒ 31 Diagnostic plots for observed versus predicted values of bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634, and Ro 64-1056



The dashed line represents a correlation coefficient of 1.

●, bosentan in buffer; ●, bosentan in hepatocytes;  
 ■, Ro 48-5033 in buffer; ■, Ro 48-5033 in hepatocyte; ■, Ro 48-5033 in bile canaliculi  
 ◆, Ro 47-8634 in buffer; ◆, Ro 47-8634 in hepatocyte; ◆, Ro 47-8634 in bile canaliculi  
 ▲, Ro 64-1056 in buffer; ▲, Ro 64-1056 in hepatocyte; ▲, Ro 64-1056 in bile canaliculi

### 第三節 ヒト肝ミクロソームを用いた新規代謝経路探索

第五章 第二節の結果から、ヒト肝細胞中には図 26A に示した以外の代謝経路が存在し、そのために肝細胞中 Ro 64-1056 を過大に評価するモデルになっていると考えられた。このため、Ro 64-1056, Ro 48-5033 あるいは Ro 47-8634 を基質としたヒト肝ミクロソーム中での *in vitro* 代謝試験を検討した。

#### 第一項 実験方法

ヒト肝ミクロソーム（50 ドナーのプール，mixed gender）は XENOTECH LLC から購入した。その他の試薬は市販の等級の高いものを使用した。

CYP の補酵素として NADPH を添加したヒト肝ミクロソーム（0.5 mg/mL）中で、Ro 64-1056, Ro 48-5033 あるいは Ro 47-8634（いずれも 0.5  $\mu$ mol/L）を 0, 5, 10, 20 あるいは 30 分間 37°C で代謝させた。Ro 64-1056 については UGT の補酵素として UDPGA を添加したヒト肝ミクロソーム（0.5 mg/mL）中で、0, 5, 10, 20 あるいは 30 分間 37°C で代謝させた。所定時間基質を代謝させた後、反応液に対して 5 倍量の反応停止液（アセトニトリル／メタノール 1 : 1 混液，vol%）を添加し、反応を停止させた。

#### バッファーの組成

内容	組成
CYP 代謝	100 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7.4），5 mM 塩化マグネシウム，1 mM NADPH
UGT 代謝	50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.5），8 mM 塩化マグネシウム，5 mM UDPGA，25 $\mu$ g/mL アラメチシン

試料の前処理条件を以下に示す。

#### 前処理方法

- ←Bosentan-*d4* 調製液（50  $\mu$ L）及び Ro 48-5033-*d4* 調製液（50  $\mu$ L）を添加し，混合
- ←超音波処理（10 分）後，遠心（約 3000g，10 分）
- ←上清をガラス試験管に採取し，残渣に反応停止液 1 mL を添加後，混合
- ←超音波処理（10 分）後，遠心（約 3000g，10 分）
- ←上清を先ほど上清を回収した同じガラス試験管に採取し，混合
- ←濃縮遠心機を用いて減圧乾固
- ←初期移動相（10 mmol/L 酢酸アンモニウム（pH 3.5）／アセトニトリル（7 : 3）混液）200  $\mu$ L で再溶解

分析条件は第五章 第一節 第一項に準じた。

## 第二項 結果

Ro 64-1056 をヒト肝ミクロソーム中で代謝させたときの経時的な Ro 64-1056 濃度推移を **図 32A** 及び **図 32B** に示す。

Ro 64-1056 は補酵素として NADPH, UDPGA どちらを添加したときも、ヒト肝ミクロソーム中で安定であった。このことから、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中で Ro 64-1056 は更に代謝されず、安定であると考えられた。

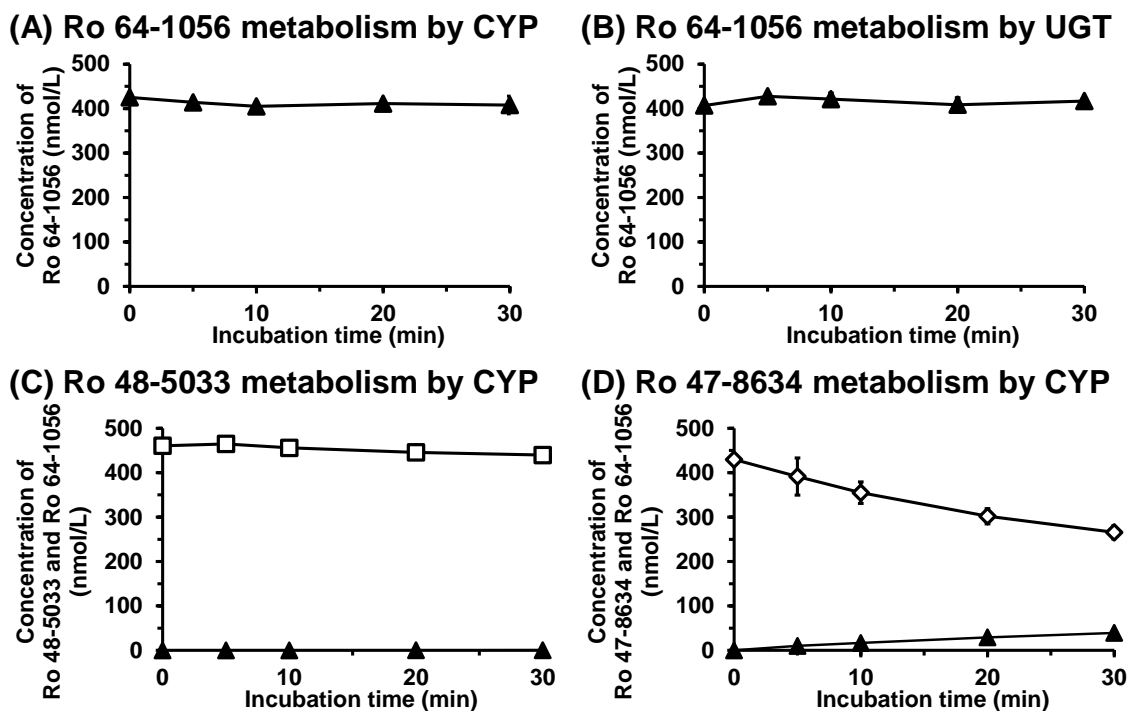
Ro 48-5033 をヒト肝ミクロソーム中で代謝させたときの経時的な Ro 48-5033 及び Ro 64-1056 濃度推移を **図 32C** に示す。

NADPH 存在下のヒト肝ミクロソーム中で Ro 64-1056 の生成が認められたが、その生成速度は遅く、また、Ro 48-5033 はヒト肝ミクロソーム中でほとんど減少しなかった。

Ro 47-8634 をヒト肝ミクロソーム中で代謝させたときの経時的な Ro 48-47-8634 及び Ro 64-1056 濃度推移を **図 32D** に示す。また、Ro 64-1056 測定における典型的な MS クロマトグラムを **図 33** に示す。

NADPH 存在下のヒト肝ミクロソーム中では Ro 64-1056 の経時的な増加が認められ、また、その生成量も Ro 48-5033 を基質とした場合と比較すると多かった。また、ヒト肝ミクロソーム中での Ro 47-8634 の経時的な減少も確認された。更に、Ro 64-1056 測定において、Ro 64-1056（保持時間約 5 分）とは別に、保持時間 6 分付近に Ro 64-1056 と同じ  $m/z$  (554.3 → 189.0) を有するイオンピークが認められた。この結果は、Ro 64-1056 の生成は Ro 47-8634 からの代謝経路が主に関与していることに加え、Ro 47-8634 には Ro 64-1056 への代謝経路とともに別の代謝経路が存在することを示唆している。このため、第四章 第二節で検討した数理モデル解析において、肝細胞中 Ro 64-1056 量が過大評価された理由として、この Ro 47-8634 の新規代謝経路がモデルに組み込まれていないためと考えられた。

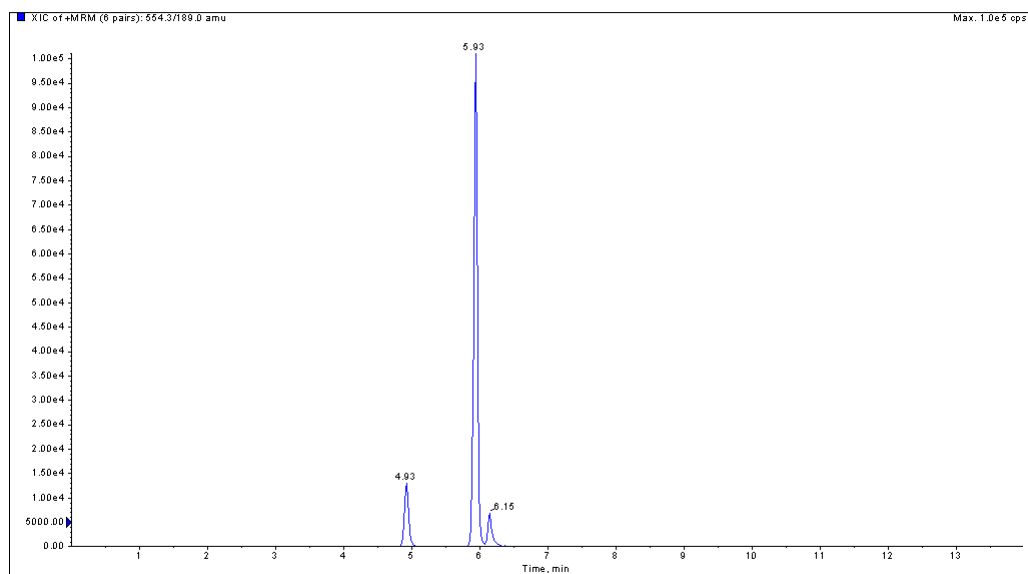
☒ 32 Metabolism of Ro 64-1056, Ro 48-5033, or Ro 47-8634 in reaction mixture of human liver microsomes



Ro 64-1056 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) was incubated with human liver microsomes in the presence of 1 mM NADPH (A) or 2 mM UDPGA (B) over 30 min. Ro 48-5033 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) was incubated with human liver microsomes in the presence of 1 mM NADPH (C) over 30 min. Ro 47-8634 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) was incubated with human liver microsomes in the presence of 1 mM NADPH (D) over 30 min. Data represent the mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments of human liver microsomes.

□, Ro 48-5033; ◇, Ro 47-8634; ▲, Ro 64-1056

**☒ 33 Typical MS-chromatogram for determination of Ro 64-1056 in reaction mixture of Ro 47-8634 with human liver microsomes**



Ro 47-8634 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) was incubated with human liver microsomes for 30 min.



### 第三項 新規代謝物の構造推定

ヒト肝細胞中及びヒト肝ミクロソーム中で Ro 47-8634 から Ro 64-1056 以外に別の新規代謝物が生成することが示唆された。このため、第五章 第三項 第一項で得られた測定試料を用い、MS/MS フラグメント解析による新規代謝物の構造推定を行った。

#### LC-MS/MS 条件

HPLC システム : 1100 series

カラム : Synergi Polar RP, 4  $\mu$  m, 150 $\times$ 2.0 mm ID (Phenomenex)

カラム温度 : 40°C

オートサンプラー温度 : 4°C

移動相 : A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.5)

B) アセトニトリル

Time (min)	% A	% B
0	70	30
1	70	30
7	10	90
8	10	90
9	70	30
14	70	30

流速 : 400  $\mu$  L/min

Ion source : Turbo Spray

Scan type : Product ion

Scan time : 1 sec

Polarity : Positive

DP, CE, CXP : 106 V, 45 V, 14 V

Product of : 554.3 Da

Scan range : 50 to 600 Da

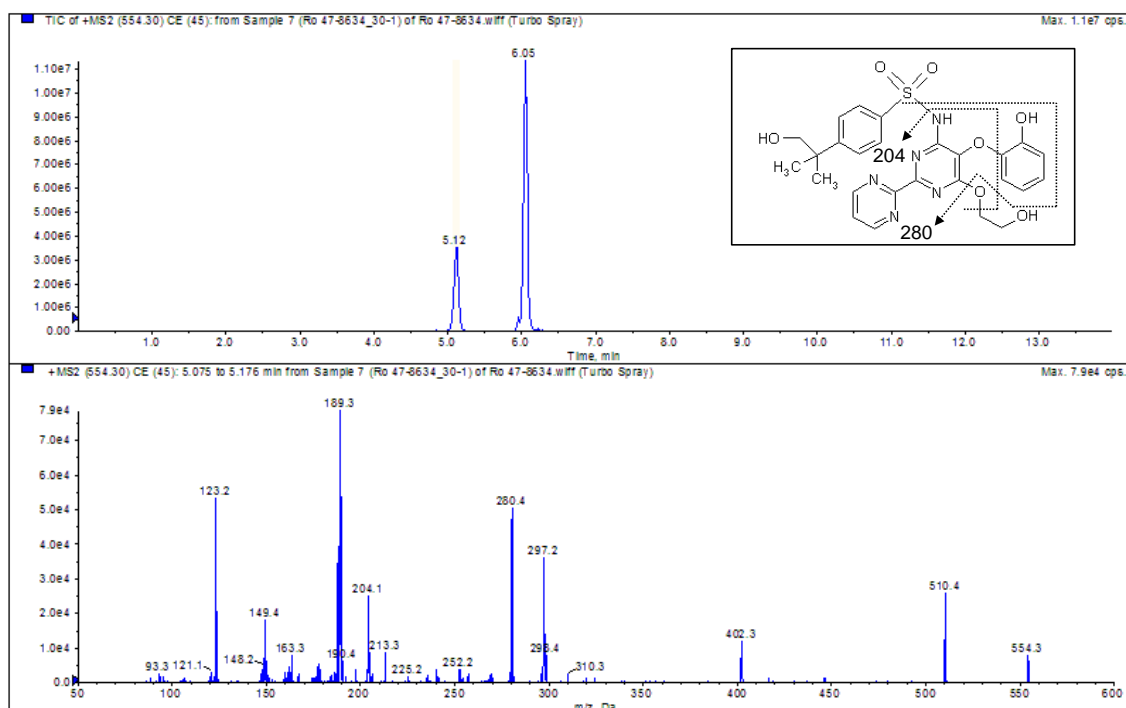
### 第四項 結果

Ro 64-1056 及び未同定のイオンピークの MS/MS フラグメントパターンを図 34 に示す。

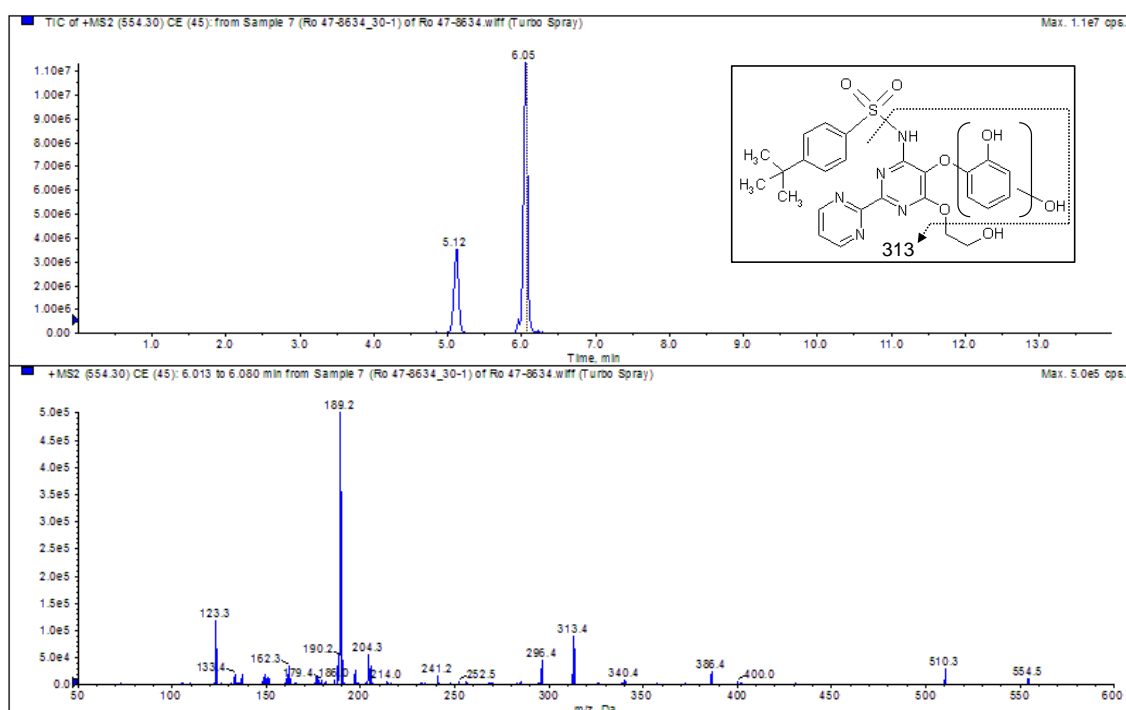
保持時間約 5 分のイオンピーク，すなわち Ro 64-1056 の特徴的な MS/MS フラグメントとして，189.3，204.1 及び 280.4 が認められた（図 34A）。一方，保持時間約 6 分のイオンピークの MS/MS フラグメントには 189.2 及び 204.3 が認められたが，280 の MS/MS フラグメントは検出されず，更に，Ro 64-1056 では認められなかった 313.4 の MS/MS フラグメントが認められた（図 34B）。これらの結果から，保持時間約 6 分の新規代謝物は，フェノール基の一部が水酸化された構造であると推定され，この新規代謝物を M4 と命名した。

### ☒ 34 MS/MS fragmentations by product ion scan

#### (A) Ro 64-1056



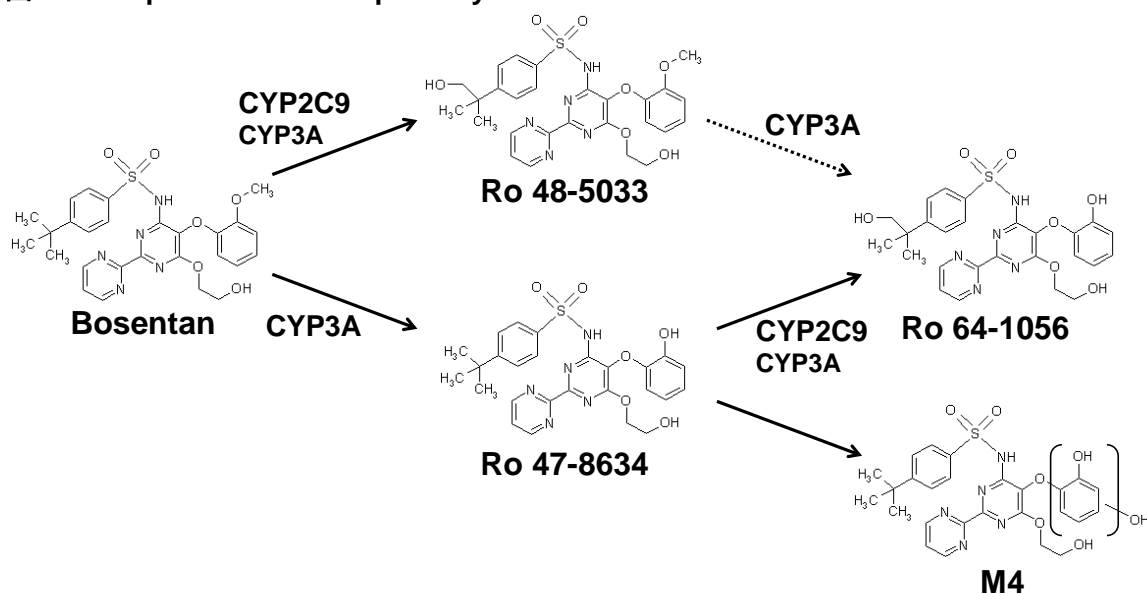
#### (B) Novel metabolite (M4)



#### 第四節 新規代謝経路を組み込んだモデリング再解析

第五章 第三節の結果から、既報の bosentan の代謝経路に基づく肝動態モデルで肝細胞中 Ro 64-1056 量が過大評価される理由として、Ro 47-8634 から M4 への代謝経路が組み込まれていなかったことが考えられた。第五章 第三節の結果から想定される bosentan の代謝経路を図 35 に示す。本節では、Ro 47-8634 のこの新規代謝経路を組み込んだ肝動態モデルで再解析を行った。

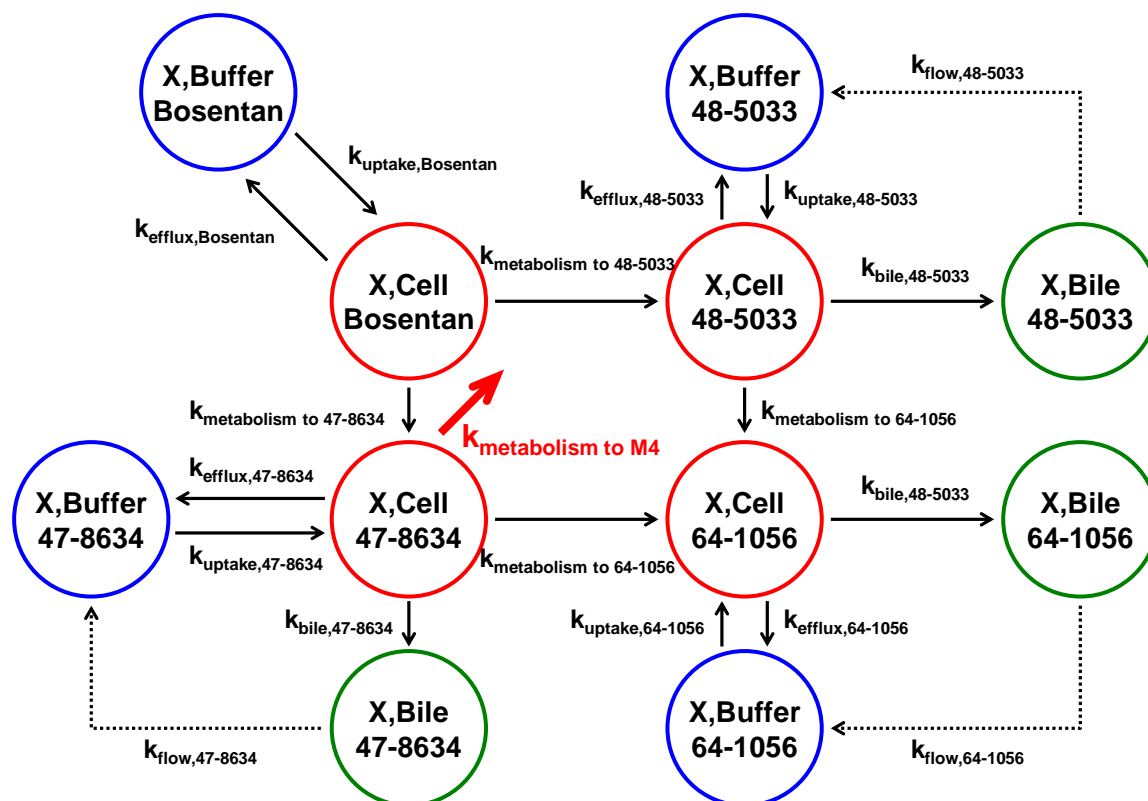
図 35 Proposed metabolic pathway of bosentan in humans



#### 第一項 解析方法

第五章 第二節 第一項に準じて解析を行った。再構築したモデル式をに示す。

図 36 Schema of nonlinear mixed effect models for hepatic disposition of bosentan and its metabolites in sandwich-cultured human hepatocytes incorporated into metabolic pathway of M4



$k_{\text{uptake}}$ ,  $k_{\text{efflux}}$ ,  $k_{\text{bile}}$  and  $k_{\text{flow}}$  are the first-order rate constants for uptake, basolateral efflux, biliary excretion, and flow from the bile canaliculi to the buffer of bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634, or Ro 64-1056, respectively.  $k_{\text{metabolism}}$  is the first-order rate constant of intracellular metabolism.

以下の微分方程式によって，bosentan 添加後のサンドイッチ培養ヒト肝細胞における各一次速度定数を再度推定した。

$$\begin{aligned} \frac{dX_{\text{Bosentan},m}}{dt} &= -k_{\text{uptake,Bosentan}} \times X_{\text{Bosentan},m} + k_{\text{efflux,Bosentan}} \times X_{\text{Bosentan},c} \\ \frac{dX_{\text{Ro 48-5033},m}}{dt} &= -k_{\text{uptake,Ro 48-5033}} \times X_{\text{Ro 48-5033},m} + k_{\text{efflux,Ro 48-5033}} \times X_{\text{Ro 48-5033},c} \\ &\quad + k_{\text{flow,Ro 48-5033}} \times X_{\text{Ro 48-5033},b} \\ \frac{dX_{\text{Ro 47-8634},m}}{dt} &= -k_{\text{uptake,Ro 47-8634}} \times X_{\text{Ro 47-8634},m} + k_{\text{efflux,Ro 47-8634}} \times X_{\text{Ro 47-8634},c} \\ &\quad + k_{\text{flow,Ro 47-8634}} \times X_{\text{Ro 47-8634},b} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{dX_{Ro\ 47-8634,m}}{dt} &= -k_{uptake,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,m} + k_{efflux,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,c} \\
&\quad + k_{flow,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,b} \\
\frac{dX_{Bosentan,c}}{dt} &= k_{uptake,Bosentan} \times X_{Bosentan,m} \\
&\quad - (k_{metabolism\ to\ Ro\ 48-5033} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 47-8634} + k_{efflux,Bosentan}) \\
&\quad \times X_{Bosentan,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 48-5033,c}}{dt} &= k_{uptake,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,m} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 48-5033} \times X_{Bosentan,c} \\
&\quad - (k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} + k_{efflux,Ro\ 48-5033} + k_{bile,Ro\ 48-5033}) \\
&\quad \times X_{Ro\ 48-5033,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 47-8634,c}}{dt} &= k_{uptake,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,m} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 47-8634} \times X_{Bosentan,c} \\
&\quad - (k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} + k_{metabolism\ to\ M4} + k_{efflux,Ro\ 47-8634} \\
&\quad + k_{bile,Ro\ 47-8634}) \times X_{Ro\ 47-8634,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 64-1056,c}}{dt} &= k_{uptake,Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 64-1056,m} + k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 48-5033,c} \\
&\quad + k_{metabolism\ to\ Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 47-8634,c} \\
&\quad - (k_{efflux,Ro\ 64-1056} + k_{bile,Ro\ 64-1056}) \times X_{Ro\ 64-1056,c} \\
\frac{dX_{Ro\ 48-5033,b}}{dt} &= k_{bile,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,c} - k_{flow,Ro\ 48-5033} \times X_{Ro\ 48-5033,b} \\
\frac{dX_{Ro\ 47-8634,b}}{dt} &= k_{bile,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,c} - k_{flow,Ro\ 47-8634} \times X_{Ro\ 47-8634,b} \\
\frac{dX_{Ro\ 64-1056,b}}{dt} &= k_{bile,Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 64-1056,c} - k_{flow,Ro\ 64-1056} \times X_{Ro\ 64-1056,b}
\end{aligned}$$

ここで、 $k_{uptake}$ 、 $k_{efflux}$  及び  $k_{bile}$  はそれぞれ血液側から肝細胞内への取り込み（basolateral uptake）、肝細胞内から血液側への排出（basolateral efflux）及び肝細胞内から胆汁中への排泄（biliary excretion）過程の一次速度定数を示す。 $k_{metabolism}$  は細胞内代謝（intracellular metabolism）過程の一次速度定数を示す。 $k_{flow}$  は毛細胆管腔からバッファーへの漏出（flow）の一次速度定数を示す。 $X$  は bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 あるいは Ro 64-1056 の各コンパートメントにおける量を示し、付随する m, c 及び b はそれぞれ外部メディウム（バッファー）、肝細胞及び毛細胆管腔を意味する。

得られたパラメータ推定値を基に各時点の bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 を予測し、実測値との比較を行った。

## 第二項 結果

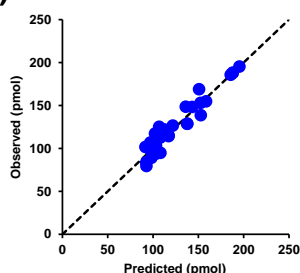
図 35 に示した Ro 47-8634 から M4 への代謝経路を組み込んだモデルに基づいて、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中の bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 の各一次速度

定数を推定した。得られたパラメータ推定値から求めた各時点の予測値と実測値のスクエアープロットを図 37 に示す。

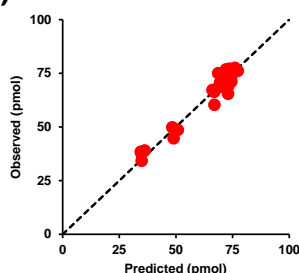
肝細胞中 Ro 64-1056 の予測は大幅に改善し (図 37J) , 且つその他のコンパートメント中の全ての化合物の予測は, 図 31 の結果とほぼ変わらず, また, 実測値とほぼ一致した。このことは, Ro 47-8634 から M4 への代謝一次速度定数 ( $k_{\text{metabolism to M4}}$ ) が図 30 では Ro 64-1056 への代謝一次速度定数 ( $k_{\text{metabolism to Ro 64-1056}}$ ) に見かけ上組み込まれていたために, 肝細胞中 Ro 64-1056 を過大に予測したこと, 並びに Ro 47-8634 から M4 への代謝一次速度定数は, その他の一次速度定数に影響を及ぼさないことを示すものである。また, Ro 47-8634 から M4 以外に, 別の代謝経路がヒト肝細胞中には存在しない, あるいはその程度は小さいこと間接的に説明するものとも考えられる。なお表 8 に示すように, ほぼ全てのパラメータ推定値の %RSE は 30%未満であったことから, パラメータ推定は良好と考えられた。

☒ 37 Diagnostic plots for observed versus predicted values of bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634, and Ro 64-1056 in the model incorporated into metabolic pathway of M4

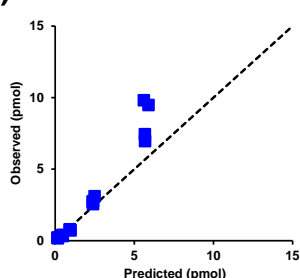
(A) Bosentan in buffer



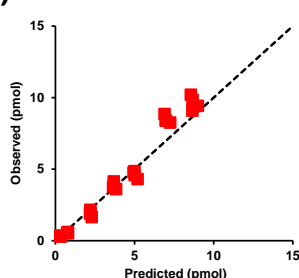
(B) Bosentan in cells



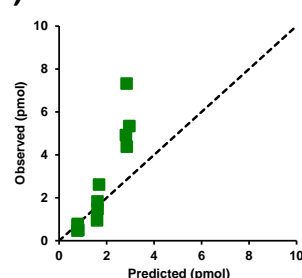
(C) Ro 48-5033 in buffer



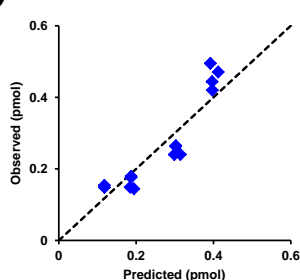
(D) Ro 48-5033 in cells



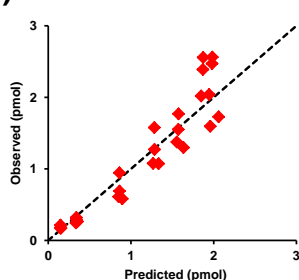
(E) Ro 48-5033 in bile



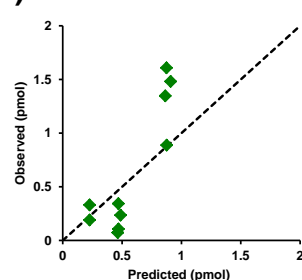
(F) Ro 47-8634 in buffer



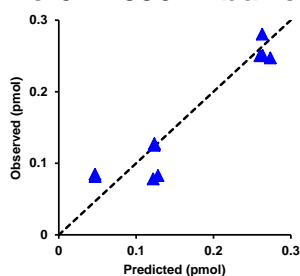
(G) Ro 47-8634 in cells



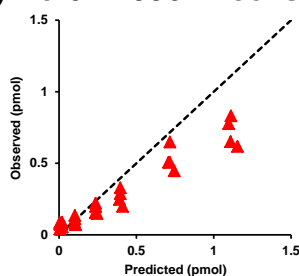
(H) Ro 47-8634 in bile



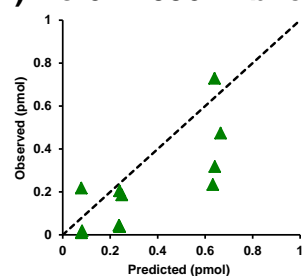
(I) Ro 64-1056 in buffer



(J) Ro 64-1056 in cells



(K) Ro 64-1056 in bile



The dashed line represents a correlation coefficient of 1.

●, bosentan in buffer; ●, bosentan in hepatocytes;

■, Ro 48-5033 in buffer; ■, Ro 48-5033 in hepatocyte; ■, Ro 48-5033 in bile canaliculi

◆, Ro 47-8634 in buffer; ◆, Ro 47-8634 in hepatocyte; ◆, Ro 47-8634 in bile canaliculi

▲, Ro 64-1056 in buffer; ▲, Ro 64-1056 in hepatocyte; ▲, Ro 64-1056 in bile canaliculi

**表 8 Parameter estimates from the final population pharmacokinetic model**

Compound	Parameter	Estimate (min <sup>-1</sup> )	%RSE
Bosentan	k <sub>uptake</sub>	0.0817	3.9
	k <sub>efflux</sub>	0.104	4.5
	k <sub>metabolism to 48-5033</sub>	0.00578	3.7
	k <sub>metabolism to 47-8634</sub>	0.00291	7.9
Ro 48-5033	k <sub>uptake</sub>	0	FIXED
	k <sub>efflux</sub>	0.0163	8.2
	k <sub>metabolism to 64-1056</sub>	0	FIXED
	k <sub>bile</sub>	0.0216	10.6
	k <sub>flow</sub>	0.0397	28.0
Ro 47-8634	k <sub>uptake</sub>	0.0822	28.2
	k <sub>efflux</sub>	0.0183	11.5
	k <sub>metabolism to 64-1056</sub>	0.0227	9.1
	k <sub>metabolism to M4</sub>	0.0538	31.8
	k <sub>bile</sub>	0.0139	15.3
	k <sub>flow</sub>	0	FIXED
Ro 64-1056	k <sub>uptake</sub>	0.0604	40.4
	k <sub>efflux</sub>	0.0227	9.1
	k <sub>bile</sub>	0.0289	32.2
	k <sub>flow</sub>	0	FIXED

The parameters were estimated using NONMEM (subroutine ADVAN 13) using mass balance–time profiles of the hepatic disposition of bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 and Ro 64-1056 in sandwich-cultured human hepatocytes.



## 第五節 小括

本章では、肝臓内で生成した代謝物が体循環にあまり移行せず、胆汁中に排泄されるモデル薬物として bosentan を選択し、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での bosentan 及びその代謝物 (Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056) の肝動態を検討した。得られた経時的な量的推移に対するモデル解析を試みたところ、既報の代謝経路に基づくモデルでは肝細胞中 Ro 64-1056 を過大評価する結果が得られた。サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 肝動態試験において、bosentan, Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 の測定値から算出した物質収支は、反応時間を問わず 90%前後と一定であった (data not shown)。一般に 90%程度の回収率は良好と見なされ、また、Ro 64-1056 の生成量は全体の 1%にしか過ぎないことから、物質収支にギャップが存在していることを上記の *in vitro* 試験の結果から推察することは困難と考えられる。しかし、*in vitro* 試験の結果を更に速度論に基づいて解析することで、明確に物質収支のギャップを示唆する結果が得られた。このように、システム内のキネティクスをより定量的に理解できる点において、モデル解析は有用な手法であり、今回の結果はそれを明瞭に表す結果と考えられた。

ヒト肝ミクロソーム中で認められた M4 のイオンピークはサンドイッチ培養ヒト肝細胞中でも認められている (data not shown)。また、放射性標識体を用いたヒトマスバランス試験において、尿中及び糞中の代謝物組成では複数の未同定代謝物が検出されている<sup>107)</sup>、本研究で用いた LC 条件はカラムや移動相条件等、上記論文と部分的に異なる点があるものの、bosentan 及びその代謝物 (Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056) のクロマトグラムにおける溶出順を考えると、上記論文における保持時間約 22 分の代謝物ピークが、M4 に相当すると考えられた。また、ヒト肝ミクロソーム中での *in vitro* 代謝試験におけるイオンピーク強度を比較すると、Ro 47-8634 から M4 への代謝速度は、Ro 64-1056 への代謝速度よりも速いことが示唆される。ヒト血漿中での Ro 64-1056 の曝露量は Ro 48-5033 に次いで多いことに加え<sup>106)</sup>、ヒトマスバランス試験での尿中のクロマトグラム中に M4 に相当する代謝物ピークが認められていることから<sup>107)</sup>、M4 はヒト血漿中である程度曝露されている代謝物と考えられる。

Bosentan の長期投与試験 (5 年間の追跡調査) の結果から、bosentan を投薬された 16.8% の被験者において、肝逸脱酵素で肝障害のマーカーである血清中アラニンアミノ基転移酵素又はアスパラギン酸アミノ基転移酵素活性の上昇が認められており<sup>108)</sup>、bosentan の肝障害リスクは高い。Bosentan による肝障害発生メカニズムの詳細は不明であるが、その影響は可逆的で投与量依存的であることに加え<sup>109) -111)</sup>、BSEP 阻害による胆汁うっ滞作用が肝障害の一つの原因と考えられている<sup>110) ,111)</sup>。また最近、PBPK に基づいた薬物と胆汁酸のヒト血漿中及び肝臓中濃度推移の変動から、胆汁うっ滞型ヒト肝障害を予測する試みが相次いで

報告されているが、bosentan についてはその影響が過小評価される懸念が報告されている<sup>112)</sup>。この原因の一つとして、上記 PBPK モデルでは bosentan のみの影響を考慮したものであり、代謝物の影響が考慮されていないことが挙げられる。すなわち、bosentan はラット Bsep に対して強い阻害作用を示すが ( $K_i$ :  $12 \mu\text{mol/L}$ )、Ro 47-8634 も同程度の阻害作用 ( $K_i$ :  $8.5 \mu\text{mol/L}$ ) を有することが報告されている<sup>110)</sup>。ヒト BSEP に対する bosentan の各代謝物の阻害強度は不明であるが、bosentan による肝障害リスクを評価する場合は、bosentan に加えて代謝物による肝障害リスクも考慮する必要性が考えられる。このため今後、M4 を含む代謝物の肝障害リスクに関する更なる研究が期待される。また、本研究で新たに見つかった M4 についてはその構造をより詳細に検討するとともに、薬物間相互作用や肝障害リスクの面から、Ro 47-8634 から M4 の代謝に関与する CYP 分子種を同定することも重要と考えられる。今後、これらの研究が更に発展することが期待される。

Ro 47-8634 から M4 への代謝経路を組み込んだ肝動態モデルにおいて、Ro 48-5033、Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 の  $k_{\text{efflux}}$  はそれぞれ  $0.0163$ ,  $0.0183$  及び  $0.0227 \text{ min}^{-1}$  と推定された。また、Ro 48-5033、Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 の  $k_{\text{bile}}$  はそれぞれ  $0.0216$ ,  $0.0139$  及び  $0.0289 \text{ min}^{-1}$  と推定された。これら輸送一次速度定数は各コンパートメント中の化合物量に依存するものであり、それぞれの推定値を化合物間で比較することは不適と考えられる。すなわち、肝細胞内で生成した代謝物の体循環への移行を  $k_{\text{efflux}}$  のみを指標に予測することは不適と考えられる。一方、 $k_{\text{efflux}}$  と  $k_{\text{bile}}$  はともに、肝細胞コンパートメントからバッファーあるいは毛細胆管腔コンパートメントへの移行速度を表すものであり、同一化合物における  $k_{\text{efflux}}$  と  $k_{\text{bile}}$  の比較は妥当と考えられる。そこで、Ro 48-5033、Ro 47-8634 及び Ro 64-1056 の  $k_{\text{bile}}$  に対する  $k_{\text{efflux}}$  の輸送一次速度定数比 ( $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$ ) を検討したところ、それぞれ  $0.755$ ,  $1.317$  及び  $0.785$  と算出された。表 9 に示すように、第三章 第五節で検討した体循環に多く移行する代謝物 MPAG の  $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$  は  $2.420$  であり、体循環にあまり移行しない bosentan 代謝物の  $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$  よりも高い値を示した。このことから、サンドイッチ培養肝細胞中での輸送及び代謝のモデリング解析を行い、推定された代謝物の肝細胞内からの輸送一次速度定数比  $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$  を指標にすることで、代謝物の体循環への移行を考察できることが示唆された。

**表 9 Ratio of first-order constants for transport of formed metabolites ( $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$ ) in sandwich-cultured human hepatocytes**

Metabolite	$k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$
MPAG	2.420
Ro 48-5033	0.755
Ro 47-8634	1.317
Ro 64-1056	0.785

## 第六章 結論

MIST ガイダンス, ICH-M3(R2), 及び薬物間相互作用に関するガイダンス/ガイドラインが近年, 相次いで日米欧の規制当局から発行された. これらは全て, 一定以上の全身曝露量を示す代謝物に関する安全性及び薬物間相互作用の評価を求めるものであり, 医薬品開発における代謝物研究において, より定量的な体内動態予測の必要性が増している. このため, 薬物代謝の主役を担う肝臓中での代謝物の動態予測がこれまで以上に重要となることが予想される. サンドイッチ培養肝細胞は *tight-junction* によって毛細胆管腔を形成し, *canalicular network system* を構築する. このため, 肝細胞内から肝細胞外への *basolateral efflux* 過程と *biliary excretion* の過程を分離評価できる有益な試験系である. 更に, 肝臓内で生じる輸送や代謝を網羅的に利用でき, 且つそれらを同時に評価できる試験系と考えられる. 以上のような背景から, 本研究ではサンドイッチ培養肝細胞中での薬物の輸送と代謝を, *paroxetine*, *MPA* 及び *bosentan* を用いて検討した. 更に, *MPA* 及び *bosentan* については *in vitro* の結果を速度論に基づいたモデルで解析することで, 肝臓における代謝物の動態を予測することを試みた.

第二章では, ラットとヒトの間で輸送と代謝に種差が存在する *paroxetine* を用い, サンドイッチ培養肝細胞における代謝物組成と代謝物 (*M1-G* 及び *M1-S*) の *BEI* を検討した. その結果, 複数の代謝酵素が関与する *paroxetine* の代謝物組成は, サンドイッチ培養肝細胞と浮遊肝細胞間で差はなく, 且つ *in vivo* を反映したものであった. このため, *in vivo* で生成する代謝物は, サンドイッチ培養肝細胞中でも生成していると考えられた. また, *M1-G* がヒト, ラットともに *MRP2/Mrp2* の基質であることを明らかにし, 両者における *M1-G* の胆汁中排泄の種差は, *MRP2/Mrp2* の種差が関係すると考えられた. 一方, *M1-G* 及び *M1-S* の *BEI* は比較的高い値を示し, ヒトとラットの排泄経路の種差を考察するには至らなかった. このため, 肝細胞内で生成した代謝物の体循環への移行を予測するためには, *BEI* とは異なる速度論に基づいた指標が必要と考えられた.

第三章では, 肝細胞内で生成した代謝物が胆汁中に排泄されるとともに, 体循環にも多く移行する薬物として *MPA* を選択し, サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での輸送と代謝を検討した. 更に, 得られた *in vitro* 結果を数理モデルに基づいて解析し, 肝細胞内で生成した *MPAG* の肝動態の律速過程をシミュレーションした. その結果, *MPAG* は胆管側膜トランスポーターの良好な基質であった一方, 血液側膜を介してバッファー中へ排出されることが示唆された. また, この肝細胞内からバッファー中への移行にヒト *MRP3* 及び *MRP4* が関与することを, 膜ベシクルを用いた検討から明らかにした. 更に, サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での *MPA* 及び *MPAG* の肝動態をモデル解析し, 得られた肝動態パラメータ推定値を

変動させるシミュレーションを行った結果、ヒト肝細胞中で生成した MPAG の肝動態の律速過程は、basolateral efflux 過程であると考えられた。

第四章では、第三章で構築したサンドイッチ培養ヒト肝細胞中での MPA 及び MPAG の肝動態モデルを用い、臨床で MPA と薬物間相互作用が報告されている CsA について、その阻害過程及び影響を推定することを試みた。その結果、CsA は MPA の輸送及び MPAG へのグルクロン酸抱合代謝には影響せず、MPAG の複数の輸送過程を阻害していることが考えられた。更に、臨床的な CsA の濃度を考慮すると、MPAG の律速過程である basolateral efflux 過程は阻害せず、basolateral uptake 及び biliary excretion 過程を CsA が阻害することで、MPAG の腸肝循環が抑制され、消化管で再吸収される MPA 量が低下するために血漿中 MPA のトラフ濃度が減少すると考えられた。更に、MPAG の肝取り込み、体循環への移行及び胆汁中への排泄に関与する薬物トランスポーターの寄与を、CsA の阻害パラメータ ( $I_{\max}$ ) から推定することが出来た。

第五章では、肝細胞内で生成した代謝物が体循環にあまり移行しない薬物として bosentan を選択し、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での輸送と代謝を検討した。更に、得られた *in vitro* 結果をモデル解析し、肝細胞内で生成した代謝物の体循環への移行に関する指標探索を行った。既報の bosentan の代謝経路に基づいたモデルでは、試験系内の物質収支を速度論的に説明することが出来ず、新たな代謝経路の存在が示唆された。このため、bosentan 代謝物の新規代謝経路を検討した結果、Ro 47-8634 の代謝過程に未同定の代謝経路が存在することを明らかにし、更に、詳細な検討により新規代謝物 M4 の構造を推定することに成功した。この新規代謝経路を組み込んだ肝動態モデルを用いることで、サンドイッチ培養ヒト肝細胞中での bosentan 及び代謝物 (Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056) の量的時間推移を良好に予測することが出来た。また、肝細胞内で生成した代謝物の輸送一次速度定数比  $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$  が、肝細胞内で生成した代謝物の体循環への移行の指標となりうることが考えられた。

以上をまとめると、本研究ではサンドイッチ培養肝細胞を用いた輸送と代謝の同時評価の有用性を検討するとともに、得られた結果を数学的なモデルで解析することで、より定量的な予測へ展開することに成功した。サンドイッチ培養肝細胞では *in vivo* で生成する代謝物の肝動態を評価することができ、また、モデル解析によって、bosentan の新規代謝経路を同定することが出来た。更に、肝動態モデリングによって得られる代謝物の輸送一次速度定数比  $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$  が、体循環への移行を予測する指標になり得ることが示唆された。このことから、更に複数の薬物を用いた検討によって、その妥当性が確かめられること、及び医薬品開発への応用が期待される。

## 第七章 謝辞

本稿を終えるにあたり，終始，懇切丁寧な御指導，御鞭撻を賜りました恩師，金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 教授，玉井 郁巳先生に心より厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり，種々の御指導，御討論いただきました金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 准教授，中西 猛夫先生並びに同助教，小森 久和先生に深く感謝いたします。また，本研究を遂行するにあたり，数々の御協力をいただきました渋江 雄太修士，池永 美穂修士，和田 翔学士，スタッフ由紀子さんをはじめとする金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 薬物動態学研究室の皆さまに感謝いたします。

更に，本研究を遂行する環境を整えてくださりました，小野薬品工業株式会社 薬物動態研究部 小川 幹男前部長，今若 治夫部長，布谷 憲一博士並びに駒場 淳二博士に心より御礼申し上げます。また，本研究を遂行するにあたり，数多くの御協力をいただきました岡田 匡弘博士，鈴木 香織博士，金子 奈緒美修士をはじめとする小野薬品工業株式会社 薬物動態研究部の皆さまに深く感謝いたします。

最後に，私を医療薬学，臨床薬学の道に導いてくださるとともに，数えきれないほど多くの御指導，御鞭撻を賜りました恩師，大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 前教授，故・東 純一先生の御冥福を心よりお祈りするとともに，ここに，心から厚く御礼申し上げます。

## 第八章 引用文献

- 1) The United States Federal Drug Agency. Guidance for Industry Safety Testing of Drug Metabolites. (2008)
- 2) 日米 EU 医薬品規制調和国際会議. 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス. (2010 年)
- 3) The United States Federal Drug Agency. Guidance for Industry Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. (2012)
- 4) The European Medicines Agency. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. (2012)
- 5) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (案) . (2013 年)
- 6) Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* (2013) 138(1):103-41.
- 7) Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol.* (2013) 45(6):1121-32.
- 8) Döring B, Petzinger E. Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab Rev.* (2014) 46(3):261-82.
- 9) Watanabe T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* (2010) 37(6):575-90.
- 10) Di Martino MT, Arbitrio M, Leone E, Guzzi PH, Rotundo MS, Ciliberto D, Tomaino V, Fabiani F, Talarico D, Sperlongano P, Doldo P, Cannataro M, Caraglia M, Tassone P, Tagliaferri P. Single nucleotide polymorphisms of ABCC5 and ABCG1 transporter genes correlate to irinotecan-associated gastrointestinal toxicity in colorectal cancer patients: a DMET microarray profiling study. *Cancer Biol Ther.* (2011) 12(9):780-7.
- 11) Hallifax D, Houston JB. Evaluation of hepatic clearance prediction using in vitro data: emphasis on fraction unbound in plasma and drug ionisation using a database of 107 drugs. *J Pharm Sci.* (2012) 101(8):2645-52.
- 12) Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. *AAPS J.* (2009) 11(2):262-76.
- 13) Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-

- hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* (2005) 33(3):434-9.
- 14) Tsuda-Tsukimoto M, Maeda T, Iwanaga T, Kume T, Tamai I. Characterization of hepatobiliary transport systems of a novel alpha4beta1/alpha4beta7 dual antagonist, TR-14035. *Pharm Res.* (2006) 23(11):2646-56.
  - 15) Soars MG, Grime K, Sproston JL, Webborn PJ, Riley RJ. Use of hepatocytes to assess the contribution of hepatic uptake to clearance in vivo. *Drug Metab Dispos.* (2007) 35(6):859-65.
  - 16) Jigorel E, Houston JB. Utility of drug depletion-time profiles in isolated hepatocytes for accessing hepatic uptake clearance: identifying rate-limiting steps and role of passive processes. *Drug Metab Dispos.* (2012) 40(8):1596-602.
  - 17) Michalopoulos G, Sattler CA, Sattler GL, Pitot HC. Cytochrome P-450 induction by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in primary cultures of hepatocytes. *Science.* (1976) 193(4256):907-9.
  - 18) Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J.* (1989) 3(2):174-7.
  - 19) Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog.* (1991) 7(3):237-45.
  - 20) Kono Y, Yang S, Letarte M, Roberts EA. Establishment of a human hepatocyte line derived from primary culture in a collagen gel sandwich culture system. *Exp Cell Res.* (1995) 221(2):478-85.
  - 21) Fahrig R, Rupp M, Steinkamp-Zucht A, Bader A. Use of Primary Rat and Human Hepatocyte Sandwich Cultures for Activation of Indirect Carcinogens: Monitoring of DNA Strand Breaks and Gene Mutations in Co-cultured Cells. *Toxicol In Vitro.* (1998) 12(4):431-44.
  - 22) Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol.* (1997) 54(7):761-72.
  - 23) Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J.* (1996) 10(13):1471-84.
  - 24) Citi S. Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol.* (1992) 117(1):169-78.
  - 25) Liu X, LeCluyse EL, Brouwer KR, Gan LS, Lemasters JJ, Stieger B, Meier PJ, Brouwer KL. Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol.* (1999) 277(1 Pt 1):G12-21.

- 26) Fukuda H, Ohashi R, Tsuda-Tsukimoto M, Tamai I. Effect of plasma protein binding on in vitro-in vivo correlation of biliary excretion of drugs evaluated by sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* (2008) 36(7):1275-82.
- 27) Nakakariya M, Ono M, Amano N, Moriwaki T, Maeda K, Sugiyama Y. In vivo biliary clearance should be predicted by intrinsic biliary clearance in sandwich-cultured hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* (2012) 40(3):602-9.
- 28) Zou P, Liu X, Wong S, Feng MR, Liederer BM. Comparison of in vitro-in vivo extrapolation of biliary clearance using an empirical scaling factor versus transport-based scaling factors in sandwich-cultured rat hepatocytes. *J Pharm Sci.* (2013) 102(8):2837-50.
- 29) Fukuda H, Ohashi R, Ohashi N, Yabuuchi H, Tamai I. Estimation of transporters involved in the hepatobiliary transport of TA-0201CA using sandwich-cultured rat hepatocytes from normal and multidrug resistance-associated protein 2-deficient rats. *Drug Metab Dispos.* (2010) 38(9):1505-13.
- 30) Swift B, Yue W, Brouwer KL. Evaluation of (99m)technetium-mebrofenin and (99m)technetium-sestamibi as specific probes for hepatic transport protein function in rat and human hepatocytes. *Pharm Res.* (2010) 27(9):1987-98.
- 31) Jemnitz K, Veres Z, Tugyi R, Vereczkey L. Biliary efflux transporters involved in the clearance of rosuvastatin in sandwich culture of primary rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* (2010) 24(2):605-10.
- 32) Lepist EI, Gillies H, Smith W, Hao J, Hubert C, St Claire RL 3rd, Brouwer KR, Ray AS. Evaluation of the endothelin receptor antagonists ambrisentan, bosentan, macitentan, and sitaxsentan as hepatobiliary transporter inhibitors and substrates in sandwich-cultured human hepatocytes. *PLoS One.* (2014) 30;9(1):e87548.
- 33) Hartman JC, Brouwer K, Mandagere A, Melvin L, Gorczynski R. Evaluation of the endothelin receptor antagonists ambrisentan, darusentan, bosentan, and sitaxsentan as substrates and inhibitors of hepatobiliary transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* (2010) 88(6):682-91.
- 34) Ye ZW, Camus S, Augustijns P, Annaert P. Interaction of eight HIV protease inhibitors with the canalicular efflux transporter ABCC2 (MRP2) in sandwich-cultured rat and human hepatocytes. *Biopharm Drug Dispos.* (2010) 31(2-3):178-88.
- 35) Fukuda H, Nakanishi T, Tamai I. More relevant prediction for in vivo drug interaction of candesartan cilexetil on hepatic bile acid transporter BSEP using sandwich-cultured hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2014) 29(1):94-6.



- 36) Chatterjee S, Richert L, Augustijns P, Annaert P. Hepatocyte-based in vitro model for assessment of drug-induced cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2014) 274(1):124-36.
- 37) Jemnitz K, Veres Z, Vereczkey L. Contribution of high basolateral bile salt efflux to the lack of hepatotoxicity in rat in response to drugs inducing cholestasis in human. *Toxicol Sci.* (2010) 115(1):80-8.
- 38) Liu X, Chism JP, LeCluyse EL, Brouwer KR, Brouwer KL. Correlation of biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes and in vivo in rats. *Drug Metab Dispos.* (1999) 27(6):637-44.
- 39) Brouwer KL, Keppler D, Hoffmaster KA, Bow DA, Cheng Y, Lai Y, Palm JE, Stieger B, Evers R; International Transporter Consortium. In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. *Clin Pharmacol Ther.* (2013) 94(1):95-112.
- 40) Tetsuka K, Gerst N, Tamura K, Masters JN. Glucuronidation and subsequent biliary excretion of mycophenolic acid in rat sandwich-cultured hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2014) 29(2):129-34.
- 41) Turncliff RZ, Hoffmaster KA, Kalvass JC, Pollack GM, Brouwer KL. Hepatobiliary disposition of a drug/metabolite pair: Comprehensive pharmacokinetic modeling in sandwich-cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* (2006) 318(2):881-9.
- 42) Lee JK, Marion TL, Abe K, Lim C, Pollock GM, Brouwer KL. Hepatobiliary disposition of troglitazone and metabolites in rat and human sandwich-cultured hepatocytes: use of Monte Carlo simulations to assess the impact of changes in biliary excretion on troglitazone sulfate accumulation. *J Pharmacol Exp Ther.* (2010) 332(1):26-34.
- 43) Nakanishi T, Shibue Y, Fukuyama Y, Yoshida K, Fukuda H, Shirasaka Y, Tamai I. Quantitative time-lapse imaging-based analysis of drug-drug interaction mediated by hepatobiliary transporter, multidrug resistance-associated protein 2, in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* (2011) 39(6):984-91.
- 44) Nakanishi T, Ikenaga M, Fukuda H, Matsunaga N, Tamai I. Application of quantitative time-lapse imaging (QTLI) for evaluation of Mrp2-based drug-drug interaction induced by liver metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2012) 263(2):244-50.
- 45) Lee JK, Paine MF, Brouwer KL. Sulindac and its metabolites inhibit multiple transport proteins in rat and human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* (2010) 334(2):410-8.
- 46) Pang KS, Cherry WF, Terrell JA, Ulm EH. Disposition of enalapril and its diacid metabolite, enalaprilat, in a perfused rat liver preparation. Presence of a diffusional barrier for enalaprilat into hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* (1984) 12(3):309-13.

- 47) The United States Federal Drug Agency. Innovation or Stagnation? Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products. (2004)
- 48) The United States Federal Drug Agency. Innovation or Stagnation? Critical Path Opportunities Report. (2006)
- 49) Milligan PA, Brown MJ, Marchant B, Martin SW, van der Graaf PH, Benson N, Nucci G, Nichols DJ, Boyd RA, Mandema JW, Krishnaswami S, Zwillich S, Gruben D, Anziano RJ, Stock TC, Lalonde RL. Model-based drug development: a rational approach to efficiently accelerate drug development. *Clin Pharmacol Ther.* (2013) 93(6):502-14.
- 50) Marks DM, Park MH, Ham BJ, Han C, Patkar AA, Masand PS, Pae CU. Paroxetine: safety and tolerability issues. *Expert Opin Drug Saf.* (2008) 7(6):783-94.
- 51) Haddock RE, Johnson AM, Langley PF, Nelson DR, Pope JA, Thomas DR, Woods FR. Metabolic pathway of paroxetine in animals and man and the comparative pharmacological properties of its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* (1989) 350:24-6.
- 52) Kaye CM, Haddock RE, Langley PF, Mellows G, Tasker TC, Zussman BD, Greb WH. A review of the metabolism and pharmacokinetics of paroxetine in man. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* (1989) 350:60-75.
- 53) Jornil J, Jensen KG, Larsen F, Linnet K. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in the metabolism of paroxetine and estimation of their importance for human paroxetine metabolism using a population-based simulator. *Drug Metab Dispos.* (2010) 38(3):376-85.
- 54) Slaus K, Coughtrie MW, Sharp S, Vanhaecke T, Vercruysse A, Rogiers V. Influence of culture system and medium enrichment on sulfotransferase and sulfatase expression in male rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol.* (2001) 61(9):1107-17.
- 55) Kienhuis AS, Wortelboer HM, Maas WJ, van Herwijnen M, Kleinjans JC, van Delft JH, Stierum RH. A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicol In Vitro.* (2007) 21(5):892-901.
- 56) Treijtel N, Barendregt A, Freidig AP, Blaauboer BJ, van Eijkeren JC. Modeling the in vitro intrinsic clearance of the slowly metabolized compound tolbutamide determined in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* (2004) 32(8):884-91.
- 57) Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW. Isolated hepatocytes--past, present and future. *Cell Biol Toxicol.* (1997) 13(4-5):223-33.
- 58) Treijtel N, van Helvoort H, Barendregt A, Blaauboer BJ, van Eijkeren JC. The use of sandwich-cultured rat hepatocytes to determine the intrinsic clearance of compounds with different extraction ratios: 7-ethoxycoumarin and warfarin. *Drug Metab Dispos.* (2005) 33(9):1325-32.

- 59) Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev.* (2002) 54(10):1311-31.
- 60) Hirom PC, Millburn P, Smith RL, Williams RT. Species variations in the threshold molecular-weight factor for the biliary excretion of organic anions. *Biochem J.* (1972) 129(5):1071-7.
- 61) Levine WG. Biliary excretion of drugs and other xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1978) 18:81-96.
- 62) Kato Y, Takahara S, Kato S, Kubo Y, Sai Y, Tamai I, Yabuuchi H, Tsuji A. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Dispos.* (2008) 36(6):1088-96.
- 63) Choi MK, Kim H, Han YH, Song IS, Shim CK. Involvement of Mrp2/MRP2 in the species different excretion route of benzylpenicillin between rat and human. *Xenobiotica.* (2009) 39(2):171-81.
- 64) Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet.* (1998) 34(6):429-55.
- 65) Sanford M, Keating GM. Enteric-coated mycophenolate sodium: a review of its use in the prevention of renal transplant rejection. *Drugs.* (2008) 68(17):2505-33.
- 66) Bowalgaha K, Miners JO. The glucuronidation of mycophenolic acid by human liver, kidney and jejunum microsomes. *Br J Clin Pharmacol.* (2001) 52(5):605-9.
- 67) Shipkova M, Strassburg CP, Braun F, Streit F, Gröne HJ, Armstrong VW, Tukey RH, Oellerich M, Wieland E. Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. *Br J Pharmacol.* (2001) 132(5):1027-34.
- 68) Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem.* (1999) 45(3):419-22.
- 69) Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schütz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol.* (1999) 126(5):1075-82.
- 70) Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T. Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* (2004) 309(3):1029-35.

- 71) Westley IS, Brogan LR, Morris RG, Evans AM, Sallustio BC. Role of Mrp2 in the hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites: effect of cyclosporine. *Drug Metab Dispos.* (2006) 34(2):261-6.
- 72) Smak Gregoor PJ, van Gelder T, Hesse CJ, van der Mast BJ, van Besouw NM, Weimar W. Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant.* (1999) 14(3):706-8.
- 73) Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* (2007) 46(1):13-58.
- 74) Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol.* (1996) 36(4):315-24.
- 75) 中外製薬株式会社. セルセプト®カプセル 医薬品インタビューフォーム. (2013 年)
- 76) Naesens M, Kuypers DR, Streit F, Armstrong VW, Oellerich M, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Rifampin induces alterations in mycophenolic acid glucuronidation and elimination: implications for drug exposure in renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* (2006) 80(5):509-21.
- 77) Patel CG, Ogasawara K, Akhlaghi F. Mycophenolic acid glucuronide is transported by multidrug resistance-associated protein 2 and this transport is not inhibited by cyclosporine, tacrolimus or sirolimus. *Xenobiotica.* (2013) 43(3):229-35.
- 78) Bortfeld M, Rius M, König J, Herold-Mende C, Nies AT, Keppler D. Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience.* (2006) 137(4):1247-57.
- 79) De Bruyn T, Ye ZW, Peeters A, Sahi J, Baes M, Augustijns PF, Annaert PP. Determination of OATP-, NTCP- and OCT-mediated substrate uptake activities in individual and pooled batches of cryopreserved human hepatocytes. *Eur J Pharm Sci.* (2011) 17;43(4):297-307.
- 80) Hoffmaster KA, Turncliff RZ, LeCluyse EL, Kim RB, Meier PJ, Brouwer KL. P-glycoprotein expression, localization, and function in sandwich-cultured primary rat and human hepatocytes: relevance to the hepatobiliary disposition of a model opioid peptide. *Pharm Res.* (2004) 21(7):1294-302.
- 81) Hitzl M, Klein K, Zanger UM, Fritz P, Nüssler AK, Neuhaus P, Fromm MF. Influence of omeprazole on multidrug resistance protein 3 expression in human liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Feb;304(2):524-30.

- 82) Cattaneo D, Gaspari F, Ferrari S, Stucchi N, Del Priore L, Perico N, Gotti E, Remuzzi G. Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant patients. *Clin Transplant*. (2001) 15(6):402-9.
- 83) Kobayashi K, Ito K, Takada T, Sugiyama Y, Suzuki H. Functional analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphism type ATP-binding cassette transmembrane transporter subfamily C member 3. *Pharmacogenet Genomics*. (2008) 18(9):823-33.
- 84) Venkatasubramanian R, Fukuda T, Niu J, Mizuno T, Chidambaran V, Vinks AA, Sadhasivam S. ABCC3 and OCT1 genotypes influence pharmacokinetics of morphine in children. *Pharmacogenomics*. (2014) 15(10):1297-309.
- 85) Smak Gregoor PJ, van Gelder T, Hesse CJ, van der Mast BJ, van Besouw NM, Weimar W. Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant*. (1999) 14(3):706-8.
- 86) Barracough KA, Lee KJ, Staatz CE. Pharmacogenetic influences on mycophenolate therapy. *Pharmacogenomics*. (2010) 11(3):369-90.
- 87) Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM, Marquet P. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. (2010) 87(1):100-8.
- 88) Michelon H, König J, Durrbach A, Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Ferlicot S, Letierce A, Charpentier B, Fromm MF, Becquemont L. SLCO1B1 genetic polymorphism influences mycophenolic acid tolerance in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics*. (2010) 11(12):1703-13.
- 89) Amundsen R, Åsberg A, Ohm IK, Christensen H. Cyclosporine A- and tacrolimus-mediated inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 in vitro. *Drug Metab Dispos*. (2012) 40(4):655-61.
- 90) Liu Y, She M, Wu Z, Dai R. The inhibition study of human UDP-glucuronosyltransferases with cytochrome P450 selective substrates and inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. (2011) 26(3):386-93.
- 91) Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*. (2009) 158(3):693-705.
- 92) Horikawa M, Kato Y, Tyson CA, Sugiyama Y. Potential cholestatic activity of various therapeutic agents assessed by bile canalicular membrane vesicles isolated from rats and humans. *Drug Metab Pharmacokinet*. (2003) 18(1):16-22.

- 93) Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, Le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos.* (2005) 33(1):139-46.
- 94) Köck K, Ferslew BC, Netterberg I, Yang K, Urban TJ, Swaan PW, Stewart PW, Brouwer KL. Risk factors for development of cholestatic drug-induced liver injury: inhibition of hepatic basolateral bile acid transporters multidrug resistance-associated proteins 3 and 4. *Drug Metab Dispos.* (2014) 42(4):665-74.
- 95) Persson M, Løye AF, Jacquet M, Mow NS, Thougard AV, Mow T, Hornberg JJ. High-content analysis/screening for predictive toxicology: application to hepatotoxicity and genotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* (2014) 115(1):18-23.
- 96) El-Sheikh AA, Koenderink JB, Wouterse AC, van den Broek PH, Verweij VG, Masereeuw R, Russel FG. Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/ multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus. *Transl Res.* (2014) 164(1):46-56.
- 97) Falck P, Vethe NT, Asberg A, Midtvedt K, Bergan S, Reubsaet JL, Holdaas H. Cinacalcet's effect on the pharmacokinetics of tacrolimus, cyclosporine and mycophenolate in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* (2008) 23(3):1048-53.
- 98) Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos.* (2006) 34(7):1229-36.
- 99) Label information of NEORAL® in the United States of America. (2013)
- 100) Yau WP, Vathsala A, Lou HX, Zhou S, Chan E. Mechanism-based enterohepatic circulation model of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite: assessment of impact of cyclosporine dose in Asian renal transplant patients. *J Clin Pharmacol.* (2009) 49(6):684-99.
- 101) Naito T, Mino Y, Otsuka A, Ushiyama T, Ito T, Ozono S, Kagawa Y, Kawakami J. Impact of calcineurin inhibitors on urinary excretion of mycophenolic acid and its glucuronide in kidney transplant recipients. *J Clin Pharmacol.* (2009) 49(6):710-8.
- 102) Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T. Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2012) 27(4):368-78.
- 103) Gertz M, Cartwright CM, Hobbs MJ, Kenworthy KE, Rowland M, Houston JB, Galetin A. Cyclosporine inhibition of hepatic and intestinal CYP3A4, uptake and efflux transporters: application of PBPK modeling in the assessment of drug-drug interaction potential. *Pharm Res.* (2013) 30(3):761-80.

- 104) Seferian A, Simonneau G. Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow? *Eur Respir Rev.* (2013) 22(129):217-26.
- 105) Markova SM, De Marco T, Bendjilali N, Kobashigawa EA, Mefford J, Sodhi J, Le H, Zhang C, Halladay J, Rettie AE, Khojasteh C, McGlothlin D, Wu AH, Hsueh WC, Witte JS, Schwartz JB, Kroetz DL. Association of CYP2C9\*2 with bosentan-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther.* (2013) 94(6):678-86.
- 106) van Giersbergen PL, Halabi A, Dingemanse J. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of bosentan and its interaction with ketoconazole. *Br J Clin Pharmacol.* (2002) 53(6):589-95.
- 107) Weber C, Gasser R, Hopfgartner G. Absorption, excretion, and metabolism of the endothelin receptor antagonist bosentan in healthy male subjects. *Drug Metab Dispos.* (1999) 27(7):810-5.
- 108) Simonneau G, Galiè N, Jansa P, Meyer GM, Al-Hiti H, Kusic-Pajic A, Lemarié JC, Hoeper MM, Rubin LJ. Long-term results from the EARLY study of bosentan in WHO functional class II pulmonary arterial hypertension patients. *Int J Cardiol.* (2014) 172(2):332-9.
- 109) Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* (2002) 346(12):896-903.
- 110) Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B, Meier PJ. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther.* (2001) 69(4):223-31.
- 111) Treiber A, Äänismaa P, de Kanter R, Delahaye S, Treher M, Hess P, Sidharta P. Macitentan does not interfere with hepatic bile salt transport. *J Pharmacol Exp Ther.* (2014) 350(1):130-43.
- 112) Woodhead JL, Yang K, Siler SQ, Watkins PB, Brouwer KL, Barton HA, Howell BA. Exploring BSEP inhibition-mediated toxicity with a mechanistic model of drug-induced liver injury. *Front Pharmacol.* (2014) 5:240.

## 第九章 参考文献

1. Norikazu Matsunaga, Ken-ichi Nunoya, Masahiro Okada, Mikio Ogawa, and Ikumi Tamai. Evaluation of hepatic disposition of paroxetine using sandwich-cultured rat and human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. 2013 Apr;41(4):735-43.
2. Norikazu Matsunaga, Sho Wada, Takeo Nakanishi, Miho Ikenaga, Mikio Ogawa, and Ikumi Tamai. Mathematical modeling of the in vitro hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide in sandwich-cultured human hepatocytes. *Molecular Pharmaceutics*. 2014 Feb;11(2):568-79.
3. Norikazu Matsunaga, Kaori Suzuki, Takeo Nakanishi, Mikio Ogawa, Haruo Imawaka, and Ikumi Tamai. Modeling approach for multiple transporters-mediated drug–drug interactions in sandwich-cultured human hepatocytes: Effect of cyclosporin A on hepatic disposition of mycophenolic acid phenyl-glucuronide. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. In press (Accepted 11 October 2014)